

---

**IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS TIPO  
AMIDA EN LA SEMILLA DE LA ESPECIE *Piper tuberculatum*  
DEL VALLE DEL CAUCA**

---

ALEJANDRA GONZÁLEZ TORO



UNIVERSIDAD DEL VALLE  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
SANTIAGO DE CALI  
2015

**IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS TIPO  
AMIDA EN LA SEMILLA DE LA ESPECIE *Piper  
tuberculatum* DEL VALLE DEL CAUCA**

ALEJANDRA GONZÁLEZ TORO

Trabajo de Grado presentado como requisito parcial  
para optar por el título de Químico

DIRECTOR:  
ANA JULIA COLMENARES DE VELEZ, Ph.D.

CODIRECTORES:  
JOSÉ HIPÓLITO ISAZA, Ph.D.  
JAIME RESTREPO, Ph.D.

UNIVERSIDAD DEL VALLE  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
SANTIAGO DE CALI  
2015

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi mamá, mi papá y Andrés por su apoyo, su dedicación, acompañamiento y sobre todo por su paciencia.

A la profesora Ana Julia por aceptar ser mi directora, por su colaboración, apoyo y las correcciones de este trabajo.

Al profesor Jaime por aceptarme en su proyecto.

Al profesor Hipólito por sus valiosas explicaciones que fueron fundamentales para la culminación de este trabajo.

Al profesor Braulio Insuasty por la revisión de este trabajo y sus correcciones.

A mis compañeras del grupo GIPNA: Bibiana, Dayana, Kimberly, María Juliana y en especial agradezco a Diana y Claudia por sus consejos, sus orientaciones y sus enseñanzas. Y a todas por brindarme su amistad.

A Laura Salas y Julianna Mazuera por su amistad y los momentos compartidos durante nuestra formación.

A los profesores del Departamento de Química que contribuyeron a mi formación profesional y a la Universidad del Valle por brindarme una gran formación académica.

## ABREVIATURAS

**CCD:** cromatografía de capa delgada

**CG-EM:** cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

**DPPH:** 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

**IC<sub>50</sub>:** concentración efectiva del compuesto o extracto necesaria para reducir en un 50% la concentración inicial de DPPH

**Eq AG/ g Ext:** equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto

**GIPNA:** Grupo de Investigación en Productos Naturales y Alimentos

**m/z:** relación masas carga

**Pt:** *Piper tuberculatum*.

**RMN-<sup>1</sup>H:** resonancia magnética nuclear de hidrógeno 1.

**RMN-<sup>13</sup>C:** resonancia magnética nuclear de carbono 13.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
LISTA DE TABLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
RESUMEN.....	x
SUMARY.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	8
4. OBJETIVOS .....	9
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	9
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	9
5. METODOLOGÍA.....	10
5.1. MATERIAL VEGETAL.....	10
5.2. EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO .....	10
5.3. PRUEBAS CUALITATIVAS PRELIMINARES PARA EL EXTRACTO DE ACETO- NA 70 % (Pt3).....	11
5.4. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD CAPTORA DE RADICALES .....	11
5.5. ESTIMACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE FENOLES DEL EXTRACTO ACETONA 70% (Pt3) POR EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU .....	13
5.6. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA .....	14
5.6.1. Fraccionamiento de la fracción Pt1.1 .....	14
5.7. CROMATOGRAFIA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS CG-EM.....	14
5.8. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	14
6. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	15
6.1. EXTRACTO HEXANOICO Pt1 .....	15
6.1.1. Prueba cualitativa preliminar para alcaloides y fraccionamiento de la fracción Pt1.1 por cromatografía de columna.....	15

6.1.2. Análisis por espectrometría de masas acoplado a cromatografía de gases para caracterización de compuestos tipo amida en fracciones provenientes de Pt1.1.....	16
6.1.3. Análisis por espectrometría de masas acoplado a cromatografía de gases para caracterización de compuestos tipo amida presentes en la fracción de Alcaloides Totales provenientes de Pt1. ....	26
6.1.4. Elucidación por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) mono y bi-dimensional de piperina <b>8</b> . ....	27
6.2. EXTRACTO DE ACETONA 70% (Pt3) .....	39
6.2.1. Pruebas cualitativas preliminares.....	39
6.2.2. Cuantificación de la actividad captora de radicales y estimación del contenido total de fenoles del extracto acetona 70% (Pt3) por el método de Folin-Ciocalteau .....	39
7. CONCLUSIONES .....	41
8. BIBLIOGRAFÍA.....	42

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Piper tuberculatum</i> <sup>2</sup> .....	2
Tabla 2. Pruebas cualitativas preliminares en el extracto Pt3. ....	11
Tabla 3. Condiciones de medida para el análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.....	14
Tabla 4. Compuestos analizados por CG-EM para la fracción 26. ....	17
Tabla 5. Compuestos analizados por CG-EM para la fracción 27. ....	19
Tabla 6. Compuestos analizados por CG-EM para la fracción 29. ....	21
Tabla 7. Compuestos analizados por CG-EM para la fracción 29. ....	24
Tabla 8. Compuestos analizados por CG-EM para la fracción de alcaloides totales. ....	26
Tabla 9. Datos de RMN- <sup>1</sup> H, COSY- <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H, RMN- <sup>13</sup> C, HSQC y HMBC (CDCl <sub>3</sub> ) para la piperina <b>8</b> . ....	28

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. <i>Piper tuberculatum</i> Jacq. ....	2
Figura 2. Estructura de algunos de los metabolitos aislados de <i>P. tuberculatum</i> cuyas estructuras contienen benzo[1,3]dioxol. ....	3
Figura 3. Estructuras de algunos metabolitos presentes en <i>Piper tuberculatum</i> . ....	3
Figura 4. 1 $\beta$ -sitosterol, 2 estigmasterol, amidas: 3 plipartina, 4 dihidropiplartina y 5 ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocínámico <sup>17</sup> . ....	4
Figura 5. Estructura de piperdardina. ....	4
Figura 6. Estructura de plipartina. ....	5
Figura 7. (E)-1-(1-piperidinil)-3-[4-(trifluorometoxi)fenil]-2-propen-1-ona. ....	6
Figura 8. Proceso de extracción de las semillas de <i>Piper tuberculatum</i> (Pt). ....	10
Figura 9. Extracción de alcaloides totales en semillas de <i>P. tuberculatum</i> <sup>23</sup> . ....	11
Figura 10. Mecanismo propuesto para la reacción entre DPPH' y compuestos antioxidantes <sup>24</sup> . ....	12
Figura 11. a) Lector de microplacas b) Placa con muestras para la determinación de la actividad antioxidante con DPPH. ....	12
Figura 12. Preparación de los platos para cuantificar la actividad antioxidante con DPPH. ....	13
Figura 13. Reacción del reactivo de Dragendorff modificado con compuestos nitrogenados, ejemplo piperina. ....	15
Figura 14. Cromatografía en capa fina (sílica gel) de las fracciones 26-31 y de alcaloides totales (AT) obtenidas a partir del extracto hexanoico. Placas en a) UV onda corta, b) UV onda larga y c) reactivo de Dragendorff modificado. ....	16
Figura 15. Cromatograma de la fracción 26 de la fracción Pt1.1, método: volátiles. ....	16
Figura 16. Espectro de masas del compuesto pellitorina <b>1</b> . ....	17
Figura 17. Fragmentación propuesta de la pellitorina <b>1</b> . ....	18
Figura 18. Cromatograma de la fracción 27 de la fracción Pt1.1, método: volátiles. ....	18
Figura 19. Espectro de masas del <i>N</i> -(2,4-decadienoil)piperidina <b>2</b> . ....	19
Figura 20. Fragmentaciones propuestas de la molécula <i>N</i> -(2,4-decadienoil)piperidina <b>2</b> . ....	19
Figura 21. Espectro de masas del compuesto <i>N</i> -(2,4,6-decatrienoil)piperidina <b>3</b> . ....	20
Figura 22. Fragmentaciones propuestas para la molécula <i>N</i> -(2,4,6-decatrienoil)piperi- dina <b>3</b> . ....	20
Figura 23. Cromatograma de la fracción 29 de la fracción Pt1.1, método terpenos. ....	21
Figura 24. Espectro de masas del compuesto 4,5-dihidropiperlonguminina <b>4</b> . ....	21
Figura 25. Fragmentaciones propuestas para la molécula 4,5-dihidropiperlongumi- nina <b>4</b> . ....	22
Figura 26. Espectro de masas de la 6-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)- <i>N</i> -isobutilhex-3-enamida <b>5</b> . .....	22
Figura 27. Fragmentaciones propuestas para la molécula 6-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)- <i>N</i> - isobutilhex-3-enamida <b>5</b> . ....	23



Figura 28. Espectro de masas del compuesto 4,5,6,7-tetrahidropiperretina <b>6</b> .....	23
Figura 29. Fragmentaciones propuestas para la molécula 4,5,6,7-tetrahidropiperretina <b>6</b> .....	23
Figura 30. Espectro de masas del compuesto 6,7-dihidropiperretina <b>7</b> .....	24
Figura 31. Fragmentaciones propuestas para la molécula 6,7-dihidropiperretina <b>7</b> .....	24
Figura 32. Cromatograma de la fracción 31 de la fracción Pt1.1, método volátiles. ....	25
Figura 33. Espectro de masas del compuesto piperina <b>8</b> .....	25
Figura 34. Fragmentaciones propuestas para la molécula piperina <b>8</b> . ....	25
Figura 35. Cromatograma de alcaloides totales extraídos del extracto de hexano de las semillas de <i>Piper tuberculatum</i> , método terpenos. ....	26
Figura 36. Espectro de masas del compuesto 4,5-dihidropiperina <b>9</b> . ....	26
Figura 37. Fragmentaciones propuestas para la molécula 4,5-dihidropiperina <b>9</b> .....	27
Figura 38. Espectro RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ) de la piperina <b>8</b> . ....	29
Figura 39. Expansión 1 del espectro RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ) de la piperina <b>8</b> .....	30
Figura 40. Espectro COSY- <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> -d) de la piperina <b>8</b> . ....	31
Figura 41. Expansión 1 del espectro COSY- <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ) de la piperina <b>8</b> .....	32
Figura 42. Espectro RMN- <sup>13</sup> C y DEPT-135 (CDCl <sub>3</sub> ) de la piperina <b>8</b> .....	33
Figura 43. Espectro HSQC (CDCl <sub>3</sub> ) de la piperina <b>8</b> . ....	34
Figura 44. Expansión 1 del espectro HSQC (CDCl <sub>3</sub> ) de la piperina <b>8</b> . ....	35
Figura 45. Expansión 2 del espectro HSQC (CDCl <sub>3</sub> ) de la piperina <b>8</b> . ....	36
Figura 46. Espectro HMBC (CDCl <sub>3</sub> ) de la piperina <b>8</b> .....	37
Figura 47. Expansión 1 del espectro HMBC (CDCl <sub>3</sub> ) de la piperina <b>8</b> . ....	38
Figura 48. Comparación de la actividad captora del radical DPPH de los estándares Vitamina C y quercetina y estimación del contenido total de fenoles para el extracto Pt3 de las semillas de <i>Piper tuberculatum</i> . ....	39

## RESUMEN

Este trabajo describe la elucidación de metabolitos secundarios de tipo amidas presentes en las semillas de *Piper tuberculatum*. El extracto hexanoico de las semillas se fraccionó al hacerlo pasar por una columna de sílica gel 60, las fracciones resultantes se analizaron por cromatografía de capa fina utilizando como revelador luz UV y reactivo de Dragendorff modificado. A partir de este análisis, las fracciones que dieron positiva la reacción con el reactivo de Dragendorff modificado fueron examinadas por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas donde se caracterizaron compuestos de tipo amida. La piperina cristalizó en una de las fracciones y fue llevada a estudio por RMN. Los compuestos identificados fueron: pellitorina **1**, *N*-(2,4-decadienoil)piperidina **2**, *N*-(2,4,6-decatrienoil)piperidina **3**, 4,5-dihidropiperlonguminina **4**, 6-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-*N*-isobutilhexenamida **5**, 4,5,6,7-tetrahidropiperretina **6**, 6,7-dihidropiperretina **7**, piperina **8**, y 4,5-dihidropiperina **9**. Al extracto de acetona 70% se le cuantificó su actividad captora del radical DPPH obteniendo un  $IC_{50} = 152 \pm 22$  mg/L y se estimó un contenido total de fenoles de  $63 \pm 11$  mg AG/g ES.

**Palabras claves:** *Piper tuberculatum*, metabolitos secundarios, CG-EM, alcaloides, DPPH, Folin-Ciocalteu.

## SUMMARY

This work describes the elucidation of amide-type secondary metabolites in the seeds of *Piper tuberculatum*. Hexanoic seed extract was fractionated by passing through a column of silica gel 60, the resulting fractions were analyzed by thin layer chromatography using UV light as revealer and modified Dragendorff reagent. From this analysis, fractions revealed with modified Dragendorff reagent were examined by Gas chromatography-mass spectrometry where amide-type compounds were characterized. Piperine crystallized and one of the fractions was taken to study by NMR. Compounds identified were: pellitorine **1**, *N*-(2,4-decadienoyl)piperidine **2**, *N*-(2,4,6-decatrienoyl)piperidine **3**, 4,5-dihidropiperlonguminine **4**, 6-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-*N*-isobutilhexenamide **5**, 4,5,6,7-tetrahidropiperretine **6**, 6,7-dihidropiperretine **7**, piperine **8**, y 4,5-dihidropiperine **9**. In the acetone extract 70%, DPPH radical scavenging activity was quantified obtaining an  $IC_{50} = 152 \pm 22$  mg / L and a total phenols content was estimated in  $63 \pm 11$  mg AG/g ES.

**Keywords:** *Piper tuberculatum*, secondary metabolites, GC-MS, alkaloids, DPPH, Folin-Ciocalteu.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas producen dos tipos de compuestos: metabolitos primarios y metabolitos secundarios. Los primarios se encuentran en todas las plantas y son imprescindibles para la vida de las mismas. Son producto del metabolismo primario, entre estos se encuentran proteínas comunes, monosacáridos, ácidos nucleicos, lípidos, entre otros. Los metabolitos secundarios son biosintetizados a partir de metabolitos primarios y se encuentran restringidos en ciertos grupos de plantas. Entre sus funciones están la protección de las plantas de la ingestión de herbívoros e infección por patógenos, atrayentes polinizadores y agentes de competencia planta-planta. Los metabolitos secundarios incluyen flavonoides, terpenoides, alcaloides, entre otros. La identificación y obtención de metabolitos secundarios de plantas genera interés para el entendimiento de las diferentes actividades biológicas que se les atribuyen a las plantas.

La Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Valle impulsa la investigación en especies de Colombia con el objetivo de determinar cuáles de ellas son promisorias para remplazo de cultivos ilícitos, con tal propósito ha financiado el proyecto “Aprovechamiento de dos especies vegetales (*Piper tuberculatum* Jacq y *Jatropha curcas*) con potencial agroindustrial, como posibles reemplazos de cultivos ilícitos en los Departamentos del Valle del Cauca y del Cauca (Colombia)” como parte de la Convocatoria Interna para la conformación de un banco de proyectos de investigación 1-2012.

En este trabajo se identificaron compuestos tipo amida presentes en las semillas de *P. tuberculatum* mediante las técnicas de cromatografía de columna y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, partiendo de los extractos apolares.

Los alcaloides son bases orgánicas nitrogenadas, generalmente con un anillo heterocíclico derivado de aminoácidos, responsables de gran variedad de efectos fisiológicos intensos sobre el sistema nervioso central (SNC) de los animales, los extractos de las plantas que los contienen se han usado para envenenar flechas o para curar múltiples dolencias. Los alcaloides se han clasificado de acuerdo a la fuente de obtención, de acuerdo a la actividad fisiológica o en base a su estructura química<sup>1</sup>. Un ejemplo de su clasificación son los alcaloides del tipo de la piridina, comúnmente encontrados en plantas del género *Piper*.

En las plantas de este género también se ha reportado la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides, responsables de actividades antioxidantes de gran importancia para la prevención de enfermedades, por esto se determinó la actividad captora del radical DPPH del extracto polar de las semillas de la planta, ya que en este extracto es donde generalmente se encuentran este tipo de compuestos antioxidantes.

## 2. ANTECEDENTES

*Piper tuberculatum* es un arbusto (Figura 1) que crece en regiones tropicales y subtropicales del mundo, del que se han identificado y aislado varios compuestos como: amidas isobutílicas, pirrolidina, dihidropiridina y piperidina, que son extraídos de hojas, semillas, tallos y espigas maduras. Su clasificación taxonómica se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Piper tuberculatum*<sup>2</sup>.

<b>Nombre Científico</b>	<i>Piper tuberculatum</i>
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Phylum</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Piperales
<b>Familia</b>	Piperaceae
<b>Género</b>	<i>Piper</i>
<b>Epíteto Específico</b>	<i>tuberculatum</i>
<b>Autor Epíteto Específico</b>	Jacq.
<b>Nombre común</b>	Pipilongo, candelillo, cordoncillo.



**Figura 1.** *Piper tuberculatum* Jacq.

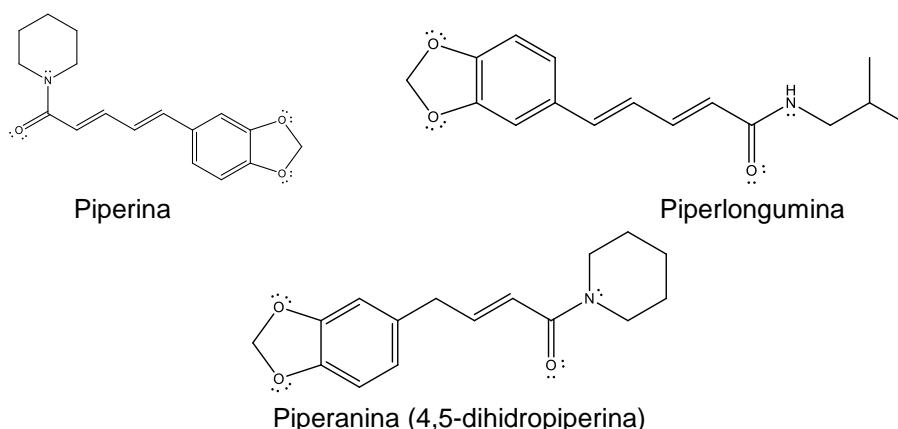
FUENTE: Autor.

Este arbusto (hojas, tallos y espigas) se ha utilizado como anti-inflamatorio y desinfectante de heridas en humanos y animales domésticos; también como analgésico y en el tratamiento de dolencias gástricas.

De esta especie han sido aislados alcaloides bioactivos picantes llamados piperamidas entre ellos las amidas piperanina, pipartina, piperina, 5,6-dihidropiperlonguminna, arboreumina, fagaramida, entre otras, todas con actividad antifúngica contra *Trichophyton rubrum*, *Mycosporum canis* y *M. gypseum*. Esta

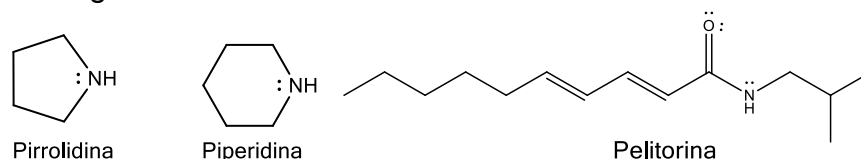
actividad ha sido investigada con extractos crudos de inflorescencias, hojas y tallos extraídos con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (2:1), EtOH y decocción<sup>3</sup>.

En 2003 se realizó una separación por HPLC de fase inversa para determinar el contenido de amidas como dihidropiplatina, plipartina, dihidropiperina, pelitorina en plantas in natura, in vitro, ex vitro y callo de *P. tuberculatum*. Se obtuvieron picos de buena detección y lineales encontrando compuestos dihidropiplatina y pelitorina en las plántulas in natura, dihidropiplatina y plipartina en ex vitro y dihidropiplatina y pelitorina en in vitro; en el callo solo se encontró la amida pelitorina<sup>4</sup>.



**Figura 2.** Estructura de algunos de los metabolitos aislados de *P. tuberculatum* cuyas estructuras contienen benzo[1,3]dioxol.

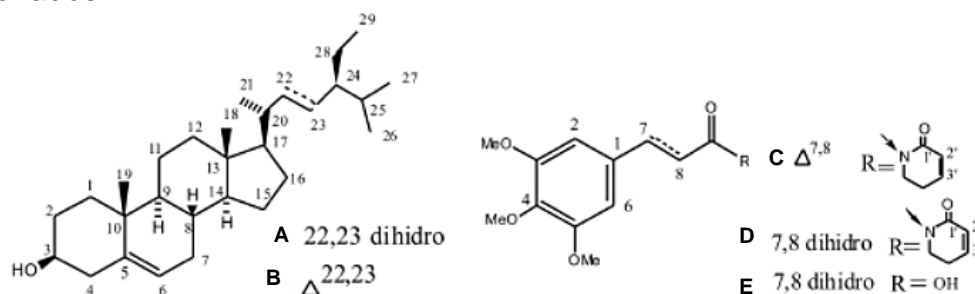
En una investigación realizada en Brasil en el 2004, se menciona la presencia de amidas isobutílicas y pirrolidina en *Piper tuberculatum*, compuestos que han demostrado ser antifúngicos<sup>5</sup>. En 2006 se reportó la actividad insecticida de extractos de *P. tuberculatum* con toxicidad contra *Musca domestica*<sup>6</sup>. Por otro lado, Molina y colaboradores indican la inhibición de la germinación de esporas del hongo *Cladosporium cladosporioides* al utilizar pelitorina (N-isobutil-2E,4E-decadienamida) obtenida a partir de semillas de *Piper tuberculatum*<sup>7</sup>. En la Figura 3 se muestran algunas de las estructuras mencionadas.



**Figura 3.** Estructuras de algunos metabolitos presentes en *Piper tuberculatum*.

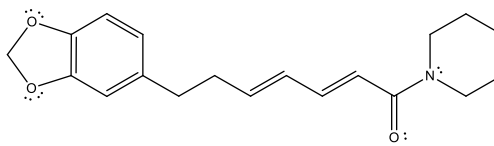
En 2005 reportaron el interés de *P. tuberculatum* por la presencia de piperamidas en hojas y que además las semillas presentan potencial para producción a gran escala de piperina, piperlonguina y pellitorina<sup>8</sup>.

En 2008, Facundo y colaboradores estudiaron por CG y CG-MS los aceites esenciales de frutos y tallos de *P. tuberculatum* obtenidos por hidrodestilación encontrando como principales componentes óxido de cariofileno 32,1% y 26,6% y (E)-cariofileno 17,7% y 12,3% en frutos y tallos respectivamente. En el extracto de etanol de la fruta se aislaron los esteroides  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol, amidas y piplartina dihidropiplartina y un derivado del ácido cinámico: ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinámico. Aunque los estudios de los aceites esenciales de esta planta no han sido siempre uniformes, lo que puede ser debido a la diversidad genética de las especies, la edad en la que se estudia, variedades ambientales y metodologías utilizadas<sup>9</sup>. En la Figura 4 se muestran algunas estructuras de los compuestos mencionados.



**Figura 4.** A  $\beta$ -sitosterol, B estigmasterol, amidas: C piplartina, D dihidropiplartina y E ácido 3,4,5-trimetoxidihidrocinámico<sup>9</sup>.

Entre otros métodos de separación se ha utilizado la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas con acetonitrilo: 0,5% ácido fórmico como fase móvil. Friedman y otros investigadores estudiaron en 2008 los extractos obtenidos utilizando los métodos mencionados, de piperamidas de variedades de pimienta comercial, donde identificaron, por técnicas como espectroscopia UV y RMN, la estructura de cada componente individual de los extractos asociados a los picos de HPLC correspondiente al espectro de masas. Piperdardine (ver Figura 5), un dihidro derivado de piperettina, fue aislado de la planta *Piper tuberculatum* y ha sido usada en Brasil como un sedante y un antídoto para mordeduras de serpiente<sup>10</sup>.

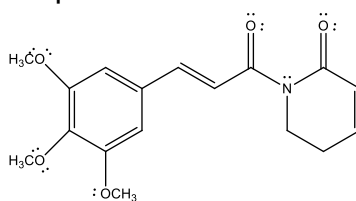


**Figura 5.** Estructura de piperdardina.

La patente US20090312373 de 2009 de Lee y Mandinova, resaltan el uso de piperlongumina (extraídos de raíces de planta *Piper* o por síntesis orgánica) y un análogo en el tratamiento del cáncer, donde proporcionan un método para inhibir la proliferación celular, reducir la metástasis y/o invasión de un cáncer y la angiogénesis, aumentar la apoptosis de una célula o población de células, entre otros aspectos. También se le ha atribuido a la piperlongumine el tratamiento de enfermedades como el asma y la depresión<sup>11</sup>.

En 2010, fueron extraídos aceites esenciales de hojas de *Piper tuberculatum* por hidrodestilación y posterior separación de constituyentes insolubles en fase acuosa por extracción con cloroformo 100%. Los investigadores encontraron un 80,4% de aceite esencial. En la identificación, por CG-MS, se encontraron como componentes mayoritarios en el aceite sesquiterpenoides (20,82%) y derivados de oxígeno en un (52,19%) y como constituyente principal en el aceite esencial el (-)-spathulenol (11,37%)<sup>12</sup>.

En 2011 se presentó la síntesis y la relación estructura-actividad de una serie de compuestos que incluyen las amidas. La pipartina aislada de la *P. tuberculatum* (ver Figura 6), es un alcaloide derivado del ácido *trans*-cinámico, ha mostrado tener una significativa actividad citotóxica contra líneas de células tumorales y un potencial mutagénico y recombinogénico en *Saccharomyces cerevisiae*. Pipartina ha presentado citotoxicidad inducida dependiente de la dosis en cultivos de *S. cerevisiae*, ya sea en fase de crecimiento estacionaria o exponencial. Asimismo se han encontrado actividades antifúngica, anti agregación plaquetaria, ansiolítica, antidepresiva<sup>13</sup> y antiproliferativa<sup>14</sup>.

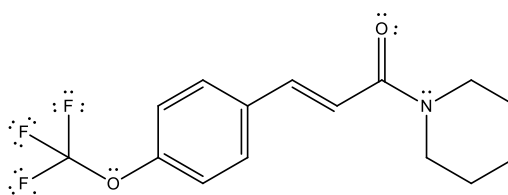


**Figura 6.** Estructura de pipartina.

La pipartina, como otras amidas biológicas, es un compuesto  $\alpha,\beta$ -insaturados que se ha buscado sintetizar debido a la importante actividad biológica a la que ha sido asociada. Kim y colaboradores produjeron una amida  $\alpha,\beta$ -insaturada inspirada en estructuras con actividades biológicas de piperamidas como la pipartina, con el objetivo de aportar en la creación una biblioteca de compuestos naturales de piperamida útil para el descubrimiento de dianas biológicas<sup>15</sup>.

En la patente EP2289528A1 de 2011, Flower y otros investigadores utilizaron extractos acuosos de pimienta donde la piperina y piperlongumina actúan como ingredientes activos, para mejorar las funciones cognitivas como el aprendizaje, la memoria y el estado de alerta. Esto debido a que son activadores de la función del hipocampo. Los inventores también mencionan que composiciones con piperina aumentan la absorción y la biodisponibilidad sistemática gastrointestinal de otros nutrientes como vitaminas. Extractos de piperina o plantas que la contienen como *Piper tuberculatum*, tienen la capacidad de inhibir la recaptación de glicina y consecuente activación de receptores neuronales<sup>16</sup>.

En 2011 se describió una biblioteca combinatoria indexada de amidas y su efecto tóxico por contacto contra el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* donde se encontró que la (E)-1-(1-piperidinil)-3-[4-(trifluorometoxi)fenil]-2-propen-1-ona (ver Figura 7) fue el compuesto más activo con una  $LD_{50} = 0,793 \mu g \text{ mg}^{-1}$  de la larva. Esta amida se evaluó también por ingestión y en la concentración más baja ( $1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) lograron la mortalidad de 83,3%<sup>17</sup>.



**Figura 7.** (E)-1-(1-piperidinil)-3-[4-(trifluorometoxi)fenil]-2-propen-1-ona.

En 2012 extractos metanólicos de Piperaceae como la *Piper tuberculatum* y de algunos compuestos aislados como dihidropiartina y piplartina fueron probados como larvicidas contra *A. darlingi*. Donde se encontraron concentraciones letales,  $DL_{50}$  y  $DL_{90}$ , desde 194 y 333 ppm para *Piper tuberculatum* y de 40 y 79 ppm para piplartina-dihidropiartina respectivamente<sup>18</sup>.

En 2013, Burci y colaboradores generaron úlceras en ratas con etanol absoluto y al administrar piplartine y frutas de *Piper tuberculatum* encontraron efectos gastroprotectores, un aumento de la mucosa gástrica, aumento de glutatión y una reducción del ácido gástrico<sup>19</sup>.

Además, se ha encontrado que la *Piper tuberculatum* tiene propiedades antidepresivas y antitumorales, estas propiedades llevaron en el 2013 a investigadores como Kim a sintetizar compuestos naturales piperamidas en fase solución, hallando una facilidad de operación y excelente pureza en el protocolo



empleado. Realizaron la síntesis de moléculas naturales a través de la adaptación de reacciones orgánicas creando subproductos solubles en agua con los que se crearon bibliotecas. Estos compuestos resultaron ser de utilidad biológica para el descubrimiento de caminos hacia receptores biológicos<sup>20</sup>.

En la patente WO2013108254 A1 de 2013, Hoffman y colaboradores se refieren a la optimización de la biodisponibilidad de un fármaco, donde mencionan el uso de la piperina para mejorar la biodisponibilidad de las sustancias utilizadas para tratar enfermedades del sistema cardiovascular, nervioso central y gastrointestinal. La piperina también ha sido utilizada como una sustancia aromática y supresora de sabores desagradables<sup>21</sup>.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Valle impulsa la investigación en especies de Colombia con el objetivo de determinar cuáles de ellas son promisorias para remplazo de cultivos ilícitos, con tal propósito ha financiado el proyecto “*Aprovechamiento de dos especies vegetales (Piper tuberculatum Jacq y Jatropha curcas) con potencial agroindustrial, como posibles reemplazos de cultivos ilícitos en los Departamentos del Valle del Cauca y del Cauca (Colombia)*” como parte de la Convocatoria Interna para la conformación de un banco de proyectos de investigación 1-2012.

Uno de los principales propósitos de la Química de los Productos Naturales, es la extracción e identificación de metabolitos secundarios en plantas promisorias.

Con este trabajo se pretende generar conocimiento científico sobre la semilla de la especie *Piper tuberculatum* del Valle del Cauca, fortaleciéndola como especie para el reemplazo de cultivos ilícitos, en las comunidades de la zona sur del municipio de Jamundí en el Valle del Cauca.

*Piper tuberculatum*, conocido como pimienta en Colombia, es un arbusto de 3 metros de altura con amentos inmaduros en flor de sabor picante. El desconocimiento científico de la especie la ha expuesto a deterioros que amenazan su existencia y permanencia en los ecosistemas y/o los sistemas productivos. Además de la identificación de metabolitos secundarios tipo amida en las semillas de *Piper tuberculatum*, se evaluará su posible actividad antioxidante.

Por consiguiente se plantean las siguientes preguntas:

¿Cuáles son los metabolitos secundarios mayoritarios tipo amida que se encuentran en las semillas de la especie *Piper tuberculatum*, planta promisorio del Valle del Cauca?, ¿Presenta actividad antioxidante la fracción polar de las semillas de la especie *Piper tuberculatum*?

De esta planta se han aislado e identificado varios compuestos como: amidas isobutílicas, pirrolidina, dihidropiridona y piperidina, que son aislados de hojas, semillas, tallos y espigas maduras. Estos compuestos generan interés debido a sus propiedades bioactivas como alta actividad larvicida y antifúngica<sup>22</sup>, insecticidas, antimicrobiana, antioxidante y mutagénica<sup>12</sup>. Sin embargo los estudios antes mencionados sobre *Piper tuberculatum*, no han sido realizados para las piperáceas de Colombia, las cuales pueden presentar diferencias respecto a investigaciones realizadas en otras partes del mundo. Así, estos conocimientos técnicos y científicos apoyarán el reemplazo de cultivos ilícitos y ayudará a generar un valor agregado a esta planta para posterior manejo poscosecha.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Contribuir al conocimiento científico de la especie *Piper tuberculatum* del Valle del Cauca identificando metabolitos secundarios mayoritarios de la semilla.

### **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 4.2.1.** Obtener extractos de polaridad creciente y separar metabolitos secundarios por técnicas de separación cromatográfica de la semilla de *Piper tuberculatum*.
- 4.2.2.** Identificar compuestos tipo amida en las semillas de *Piper tuberculatum* utilizando técnicas espectroscópicas como CG-EM y RMN.
- 4.2.3.** Identificar la capacidad captora del radical libre DPPH del extracto acetona 70% de las semillas de *Piper tuberculatum*.

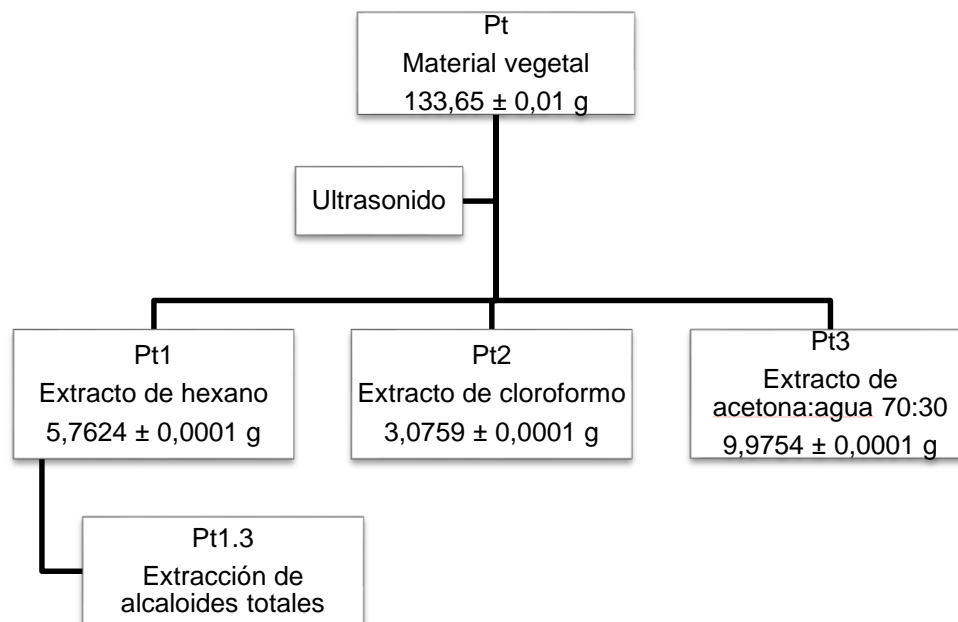
## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. MATERIAL VEGETAL

Las espigas maduras de *Piper tuberculatum* fueron colectadas en el Club de profesores Piedra Linda ubicado en las afueras de Cali, en febrero de 2014. La identificación de dicha especie fue realizada por el profesor Philip A. Silverstone-Sopkin, director del Herbario (CUVC), Departamento de Biología Universidad del Valle.

### 5.2. EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

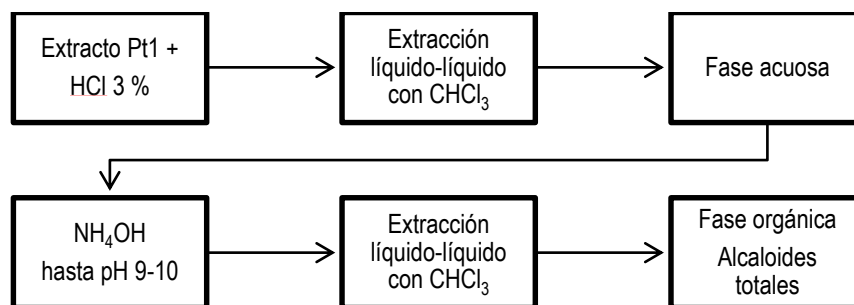
Las espigas fueron lavadas con agua destilada, posteriormente de forma manual se separaron las semillas del tallo y estas se secaron en incubadora marca Symphony™ VWR® durante 3 días. Una vez secas se molieron en un molino marca Wiley Mill Model N 2, obteniéndose 133,65 g del material. Inicialmente se llevó a cabo una extracción con hexano (Pt1) por ultrasonido por 15 minutos adicionando por cada 100 g de muestra 500 mL de disolvente. El sobrenadante obtenido se filtró a gravedad y el disolvente se evaporó a presión reducida a 100 rpm en baño de 60°C. El procedimiento descrito se repitió dos veces más. Posteriormente se realizó una segunda extracción utilizando cloroformo (Pt2) y una tercera extracción con acetona 70% (Pt3) como disolventes, siguiendo el mismo procedimiento en cada caso. Las extracciones realizadas de las semillas de *Piper tuberculatum* se muestran en la Figura 8.



**Figura 8.** Proceso de extracción de las semillas de *Piper tuberculatum* (Pt).

A continuación se realizó extracción de alcaloides totales al extracto Pt1 mediante el procedimiento mostrado en la Figura 9. Inicialmente el extracto se disuelve en una solución de HCl 3% para posterior extracción líquido-líquido con cloroformo, seguido a esto la fase acuosa fué llevada hasta pH 9 utilizando NH<sub>4</sub>OH y de nuevo se realizó una

extracción líquido-líquido con cloroformo. Los alcaloides totales fueron obtenidos en la fase apolar.



**Figura 9.** Extracción de alcaloides totales en semillas de *P. tuberculatum*<sup>23</sup>.

### 5.3. PRUEBAS CUALITATIVAS PRELIMINARES PARA EL EXTRACTO DE ACETONA 70% (Pt3)

Las pruebas presuntivas se muestran en la Tabla 2 con sus respectivos reactivos y resultados.

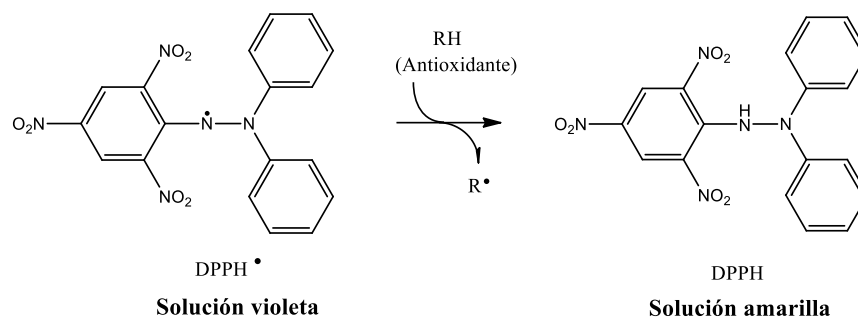
**Tabla 2.** Pruebas cualitativas preliminares en el extracto Pt3.

Familia de metabolitos secundarios	Prueba o Reactivo	Positivo para color	Resultado
Fenoles	FeCl <sub>3</sub> al 1%	Negro	+
Alcaloides	Dragendorff modificado	Naranja	+
Terpenoides y esteroides	Lieberman-Bouchard (HCCl <sub>3</sub> + anhídrido acético + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc.)	Rojo	+
Saponinas	Agitación	Producción de espuma	+
Flavonoles	HCl conc. + Zn	Naranja	+
	HCl conc.+ Mg	Naranja	-

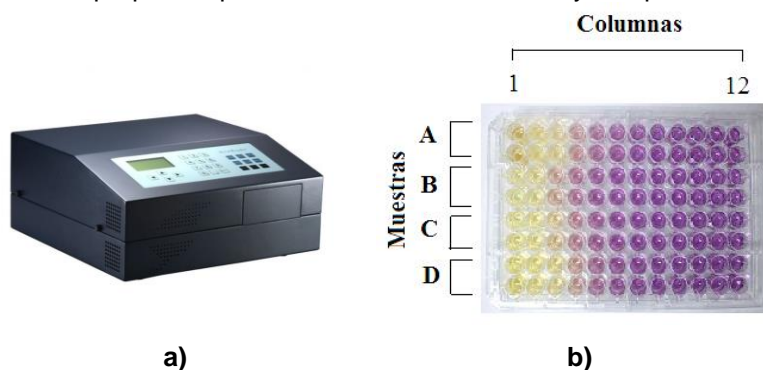
### 5.4. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD CAPTORA DE RADICALES

La actividad captora de radicales se midió utilizando el radical 1,1,-difeníl-2-picrilhidracina, DPPH. Este radical es altamente estabilizado debido a la deslocalización de los electrones por toda la molécula, que otorga un color violeta oscuro en soluciones metanólicas con una banda de absorción característica alrededor de 520 nm, en función de lo cual se llevan a cabo las determinaciones respectivas considerando su mecanismo de acción que se muestra en la Figura 10.

La actividad antioxidante se determinó con base en la disminución de absorbancia del radical DPPH mediante el uso de microplacas de 96 pozos y un lector de microplacas Metertech AccuReader M965+ (Figura 11). Esta metodología muestra los resultados como valores de IC<sub>50</sub> (concentración inhibitoria) que corresponden a la concentración del extracto necesaria para reducir en un 50 % la concentración inicial de DPPH.

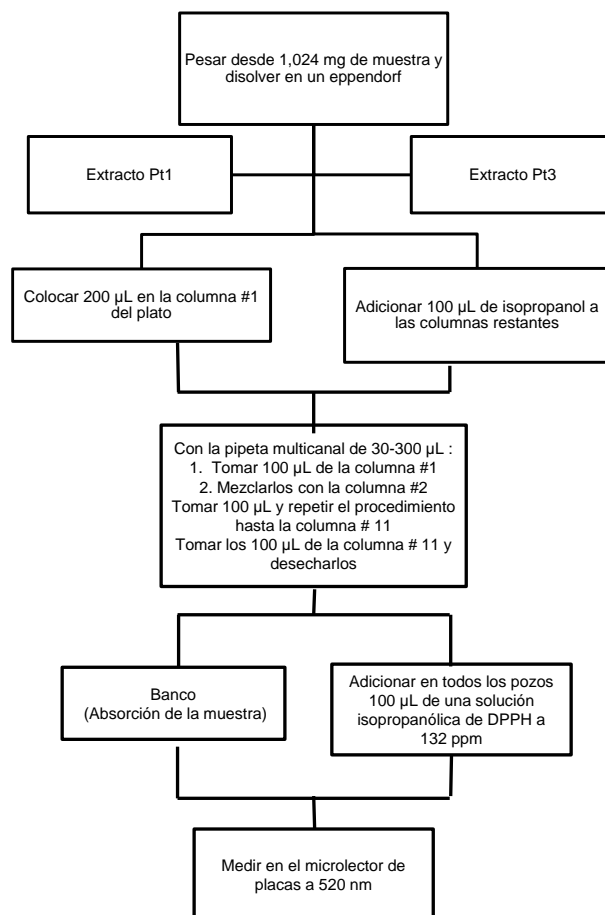


**Figura 10.** Mecanismo propuesto para la reacción entre DPPH<sup>•</sup> y compuestos antioxidantes <sup>24</sup>.



**Figura 11.** a) Lector de microplacas b) Placa con muestras para la determinación de la actividad antioxidante con DPPH.

El tratamiento de los datos y gráficos se hicieron con el programa GraphPad Prism 5 que calcula directamente y en un solo paso el valor de IC<sub>50</sub> tras evaluar la tendencia de los valores a graficar (valores de absorbancia normalizada vs concentración de la muestra). La metodología utilizada para llevar a cabo las mediciones respectivas se muestra en la Figura 12.



**Figura 12.** Preparación de los platos para cuantificar la actividad antioxidante con DPPH.

### 5.5. ESTIMACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE FENOLES DEL EXTRACTO ACETONA 70% (Pt3) POR EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU

Se pesaron 1,4 mg del extracto Pt3 y se añadió 1000 µL de disolvente (agua, IPA:agua (1:1) y MeOH:agua (1:1)) utilizando una micropipeta de 100-1000 µL a un vial de 1 mL.

Se diluyó la muestra de tal forma que las tres réplicas en la primera columna quedaron con 200 µL a una concentración de 1024 ppm, se utilizaron 3 filas y 12 columnas. En las columnas 2-6 y 8-12 se agregan 100 µL de agua destilada utilizando una pipeta multicanal de 15-300 µL en modo “Dis”. Se realizaron diluciones (1:1) utilizando la pipeta multicanal mencionada en modo “P/M” empezando en la columna 1 o 7 y hasta la columna 5 o 11. Las columnas 6 y 12 corresponden al blanco.

A todo el plato se agregó 50 µL de Reactivo F-C al 20 % en agua destilada y posteriormente se añadió 50 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 1,6% y la placa fue agitada en el equipo de lectura a 11 Hz durante 5 segundos, posteriormente el plato se incubó a 60 °C durante una hora, luego se dejó enfriar por 15 minutos y se tomó la lectura a 700 nm.

Los resultados para el contenido total de fenoles se obtienen como miligramos de ácido gálico por gramos de extracto seco (mg AG/g ES).

## 5.6. CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA

### 5.6.1. Fraccionamiento de la fracción Pt1.1

La fracción Pt1.1 se pasó por una columna de vidrio (altura: 23 cm, diámetro: 3 cm) empacada con  $85,1223 \pm 0,0001$  g de sílica gel 60 (tamaño de partícula: 0,063-0,200 mm, 70-230 mesh ASTM, Sigma-Aldrich). Se eluyó por etapas, primero con un gradiente de hexano: acetato de etilo y luego con uno de acetato de etilo: metanol (3 volúmenes de columna por etapa). Se recolectaron fracciones de 15 mL en tubos de ensayo, y se unieron teniendo en cuenta las similitudes mostradas por cromatografía en capa fina sobre sílica gel 60 F<sub>254</sub> marca Merck. Finalmente, las fracciones reunidas se dispusieron en frascos de vidrio y fueron llevadas a sequedad a temperatura ambiente.

## 5.7. CROMATOGRAFIA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS CG-EM

Las fracciones obtenidas del procedimiento realizado en el numeral 5.6.1 que dieron positivas a la prueba de Dragendorff se analizaron por CG-EM. La cromatografía de gases se realizó en una columna SH-Rxi-5Sil Ms (30 m de largo, 0.25 mm de recubrimiento) instalada en el cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas marca SHIMADZU, modelo QP2010 Ultra, operado con el software GCM Solution y la biblioteca de espectros NIST MS 2.0. En la Tabla 3 se muestran las condiciones generales utilizadas para el análisis por CG-EM.

**Tabla 3.** Condiciones de medida para el análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

MÉTODO	Volátiles	Terpenos
<b>Condiciones generales</b>		
Temperatura de inyección	280.0°C	310.0°C
Modo de inyección	Split	Split
<b>Cromatografía de gases</b>		
Temperatura del horno de la columna (°C)	Inicio (2.0 min) = 40.0 Final (20.0 min) = 280.0	Inicio (2.0 min) = 250.0 Final (10.0 min) = 310.0
Flujo	1.0 mL/min	1.0 mL/min
<b>Espectrometría de masas</b>		
Modo de ionización	SEI	
Detector	15 eV y 70 eV	
Tiempo de análisis (min)	3.0 - 75.0	
Escan	1000	
Intervalo de m/z	35.0 – 500.0	

## 5.8. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Se utilizó un equipo Bruker Avance II 400 MHz Ultra Shield™ donde se tomaron los espectros RMN<sup>1</sup>H y RMN<sup>13</sup>C utilizando los experimentos COSY, HSQC y HMBC. La muestra fue disuelta en cloroformo deuterado.

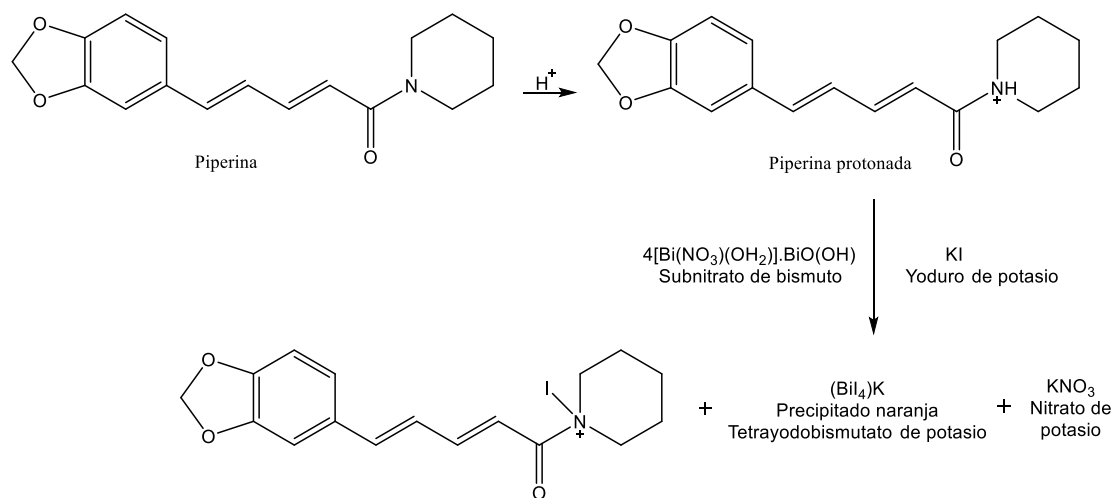


## 6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 6.1. EXTRACTO HEXANOICO Pt1

#### 6.1.1. Prueba cualitativa preliminar para alcaloides y fraccionamiento de la fracción Pt1.1 por cromatografía de columna.

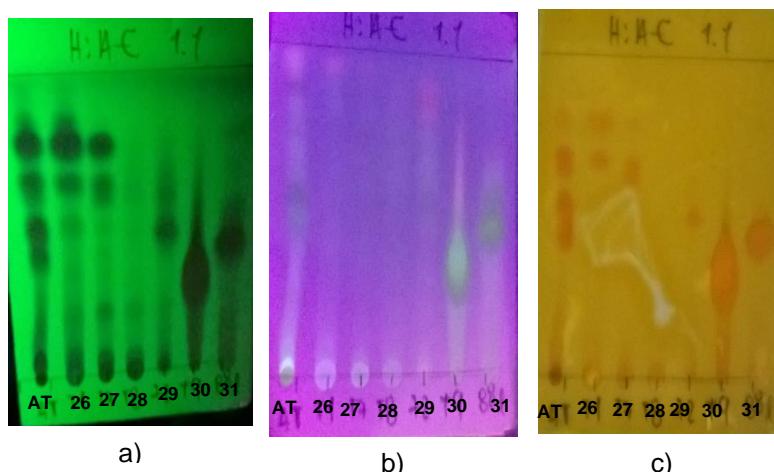
El extracto hexanoico Pt1 mostró resultados positivos para la presencia de compuestos nitrogenados (o compuestos con átomos con pares de electrones libres) al reaccionar con el reactivo de Dragendorff modificado dando lugar a un color rojo o naranja. El reactivo de Dragendorff modificado comprende dos soluciones: la solución A con 0.85 g de subnitrato de bismuto ( $4[\text{Bi}(\text{NO}_3)(\text{OH}_2)] \cdot \text{BiO}(\text{OH})$ ) disueltos en una mezcla de 10 mL de ácido acético y 40 mL de agua y la solución B con 8 g de yoduro de potasio (KI) disueltos en 20 mL de agua. En el momento de hacer el revelado se mezclaron 5 mL de la solución A con 5 mL de la solución B y 20 mL de ácido acético para luego completar a 100 mL con agua. Un ejemplo de como ocurre la reacción entre el reactivo de Dragendorff y los compuestos con nitrógeno se muestra en la Figura 13. El átomo de Bi se combina con el nitrógeno secundario o terciario del compuesto tipo alcaloide, ya protonado por el ácido acético, formando un par de iones de  $[\text{Bi}_4]^-[\text{HNR}_3]^+$ , este par de iones forma un compuesto insoluble de color rojo o naranja.



**Figura 13.** Ejemplo de la reacción del reactivo de Dragendorff modificado con compuestos nitrogenados (piperina).

Se realizó extracción de alcaloides totales (AT o Pt1.3) obteniendo dos fracciones AT y Pt1.1. La fracción de AT fue llevada a CG-EM. La extracción es basada en que debido al carácter básico que poseen los alcaloides, su solubilidad es dependiente del pH. En forma de base son solubles en disolventes orgánicos no polares como hexano y cloroformo, en forma de sal son disolubles en disolventes polares como el agua <sup>23</sup>. En la fase apolar inicial de la extracción de Alcaloides Totales (Pt1.1), se encontró aun presencia de un alto contenido de alcaloides que no fueron separados en la extracción, por lo que esta fue llevada a cromatografía de columna según el numeral 5.6.1.

Tras pasar la fracción Pt1.1 por una columna de sílica gel se obtuvieron 88 fracciones con un porcentaje de recuperación de 83,7% debido a pérdidas de compuestos altamente polares que se enlazan fuertemente a la sílica por interacciones tipo puente de hidrogeno. Las fracciones resultantes de la columna fueron monitoreadas con luz UV onda corta (254 nm), UV onda larga (365 nm) y reactivo de Dragendorff modificado. Los compuestos nitrogenados se concentraron en las fracciones 26-27 y 29-31 (Figura 14), estas fueron llevadas a CG-EM.

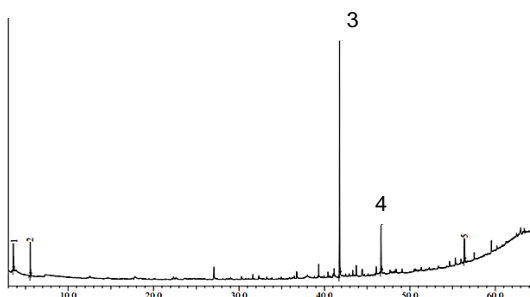


**Figura 14.** Cromatografía en capa delgada (sílica gel) de las fracciones 26-31 y de alcaloides totales (AT) obtenidas a partir del extracto hexanoico. Placas en a) UV onda corta, b) UV onda larga y c) reactivo de Dragendorff modificado.

En la fracción 31 se observó la presencia de cristales en forma de aguja, estos cristales fueron separados de la fracción por re-cristalización con isopropanol (IPA) y llevados a análisis por RMN.

#### 6.1.2. Análisis por espectrometría de masas acoplado a cromatografía de gases para caracterización de compuestos tipo amida en fracciones provenientes de Pt1.1.

Para la fracción 26 se obtuvo el cromatograma mostrado en la Figura 15. Se observan dos picos significativos, el pico # 3 y el # 4 (Tabla 4), se obtiene el espectro correspondiente a la fragmentación de cada compuesto a 15 eV en el cual se obtiene el pico del ion molecular y a 70 eV mediante el cual se elucidaron las estructuras de los compuestos.

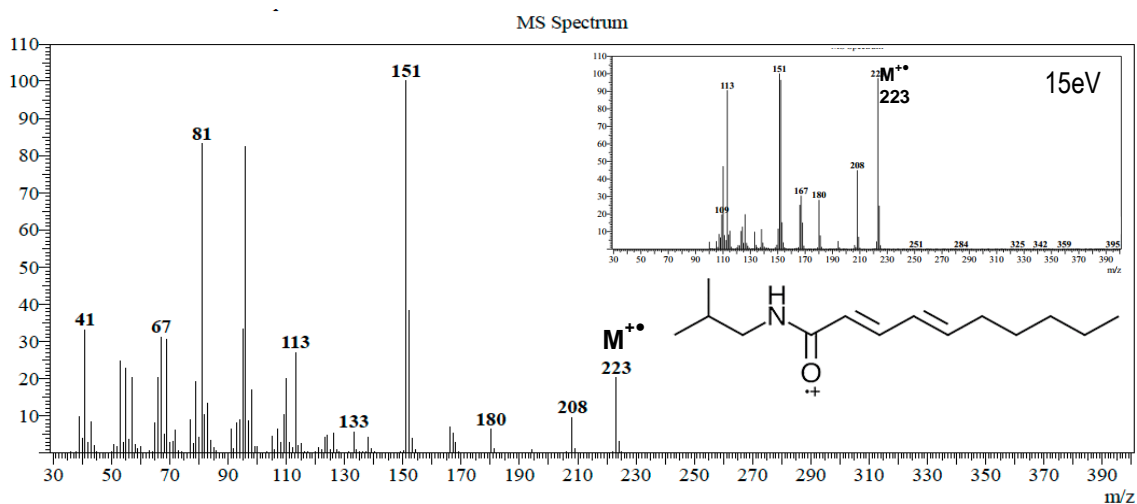


**Figura 15.** Cromatograma de la fracción 26 de la fracción Pt1.1, método: volátiles.

**Tabla 4.** Compuestos analizados por CG-EM para la fracción 26.

Pico	TR (min)	Pico base (m/z)	M <sup>+</sup> (m/z)	Área (%)	Nombre del compuesto
3	41.776	151	223	50.542	Pellitorina 1
4	46.634	84	235	9.653	N-(2,4-decadienoil)piperidina 2

La masa del compuesto para el pico #3 corresponde al valor m/z del último pico del espectro de masas tomado a 15 eV (esquina superior derecha de la Figura 16), este valor es de m/z 223 (223 uma). Se observa el pico M+1, perdidas M-15, M-43 (α-escisión). El pico base corresponde a una pérdida de M-72 (α-escisión).



**Figura 16.** Espectro de masas del compuesto pellitorina 1.

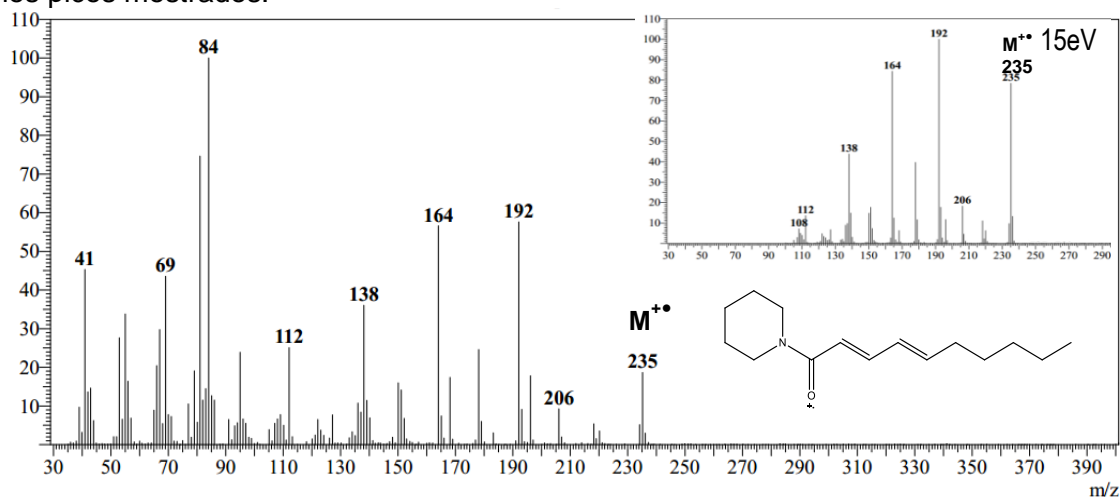
En la Figura 17 se exponen las fragmentaciones propuestas que llevan a la caracterización del compuesto donde se identifican los fragmentos para los picos más significativos, de acuerdo a esto el compuesto corresponde a la molécula pellitorina. Se observaron dos α-escisiones a ambos lados del grupo carbonilo, una de ellas dando lugar al pico base a m/z 151.



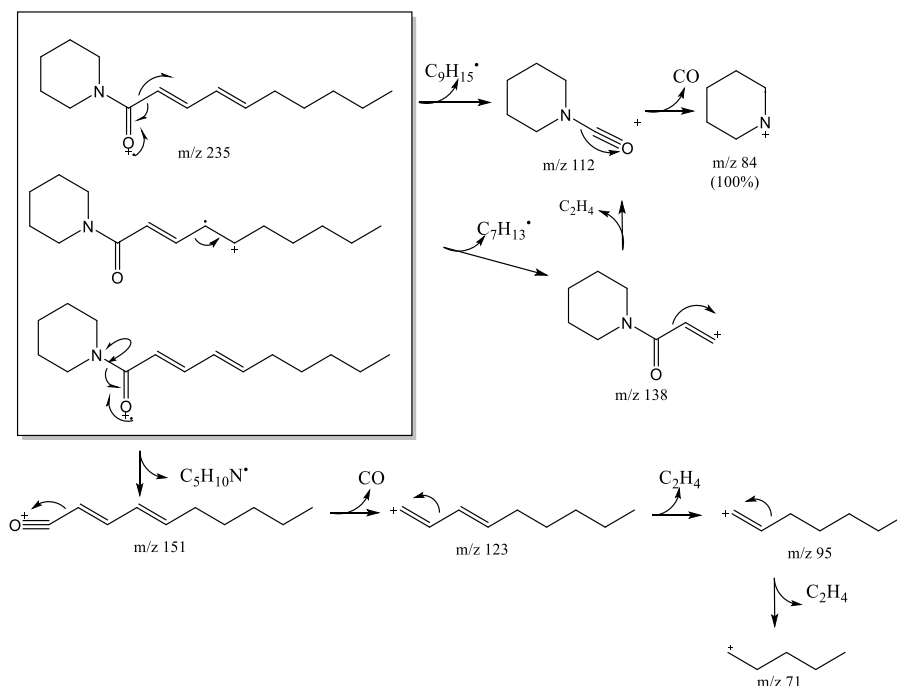
**Tabla 5.** Compuestos analizados por CG-EM para la fracción 27.

Pico	TR (min)	Pico base (m/z)	M <sup>+</sup> (m/z)	Área (%)	Nombre del compuesto
3	41.776	151	223	17.585	Pellitorina 1
4	46.634	84	235	5.235	<i>N</i> -(2,4-decadienoil)piperidina <b>2</b>
5	48.406	107	233	7.209	<i>N</i> -(2,4,6-decatrienoil)piperidina <b>3</b>

Se observan picos a M-17, M-29 y un pico base de m/z 84 (M-151). El compuesto corresponde a la identificación reportada por la biblioteca del equipo, la *N*-(2,4-decadienoil)piperidina **2**. En la Figura 20 se presentan las fragmentaciones que dan origen a los picos mostrados.

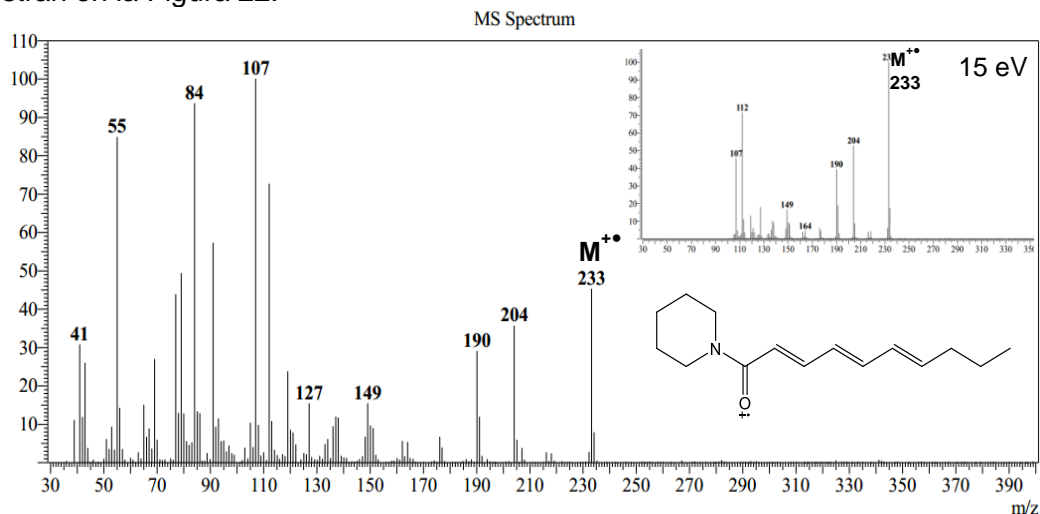


**Figura 19.** Espectro de masas de la *N*-(2,4-decadienoil)piperidina **2**.

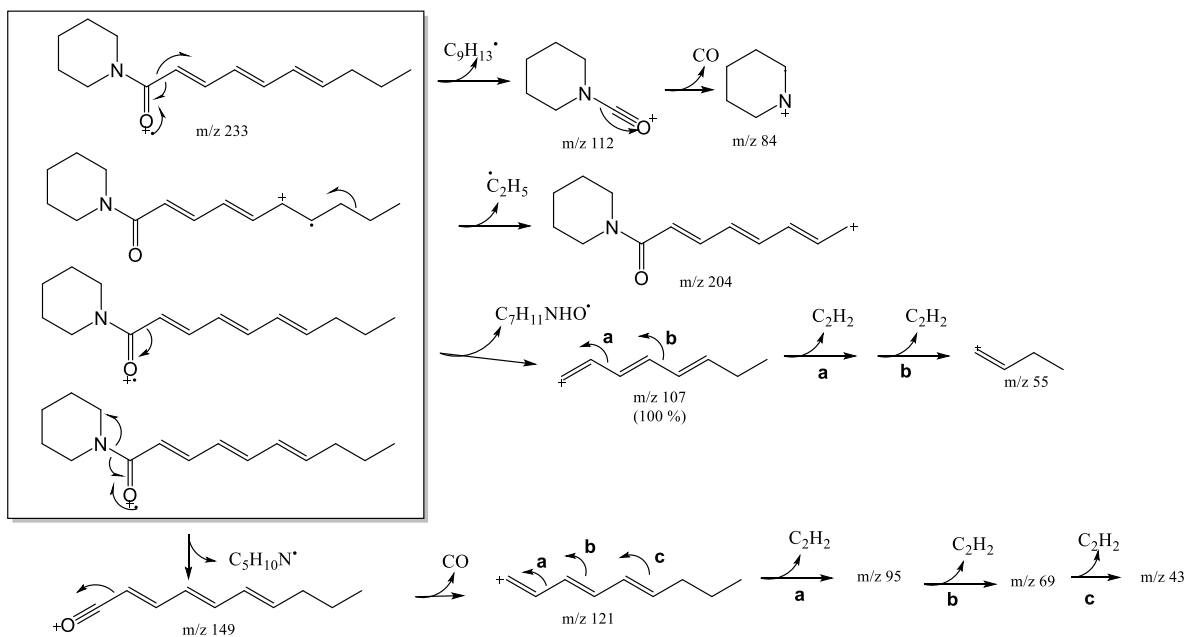


**Figura 20.** Fragmentaciones propuestas de la molécula *N*-(2,4-decadienoil)piperidina **2**.

El pico # 5 presentó el espectro de masas de la Figura 21, donde se observa el pico del ion molecular a  $m/z$  233, con pérdidas de  $M-29$  y  $M-43$ , y un pico base de  $m/z$  107. El compuesto corresponde a la *N*-(2,4,6-decatrienoil)piperidina y sus fragmentaciones se muestran en la Figura 22.

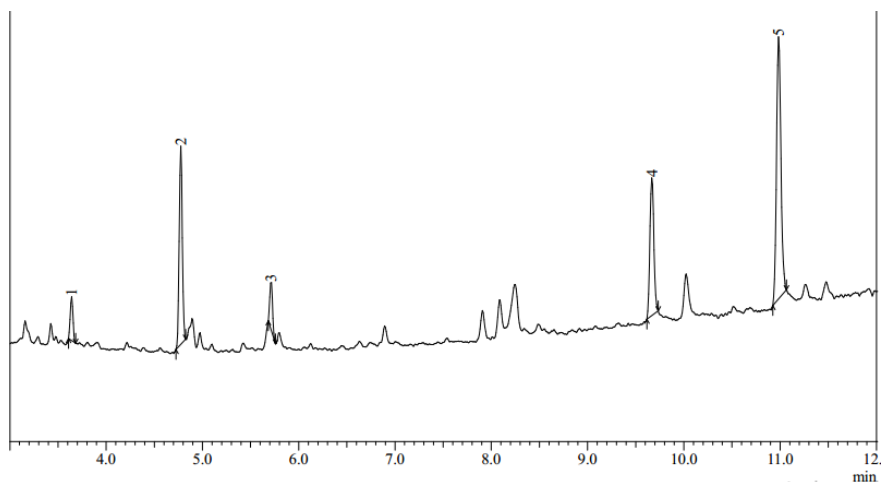


**Figura 21.** Espectro de masas del compuesto *N*-(2,4,6-decatrienoil)piperidina **3**.



**Figura 22.** Fragmentaciones propuestas para la molécula *N*-(2,4,6-decatrienoil)piperidina **3**.

La fracción 29 mostró el cromatograma de la Figura 23 donde se observan 5 picos principales. Cada uno de estos picos se analiza a continuación.



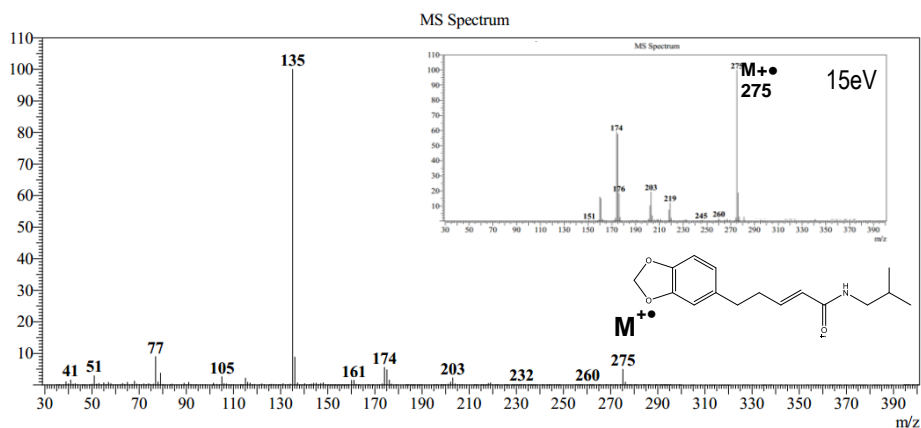
**Figura 23.** Cromatograma de la fracción 29 de la fracción Pt1.1, método terpenos.

**Tabla 6.** Compuestos analizados por CG-EM para la fracción 29.

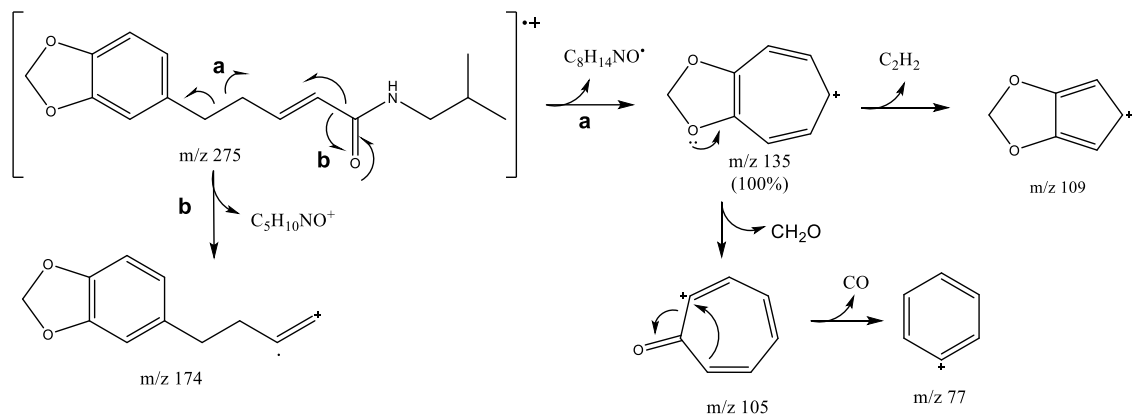
Pico	TR (min)	Pico base (m/z)	M <sup>+</sup> (m/z)	Área (%)	Nombre del compuesto
1	3.640	107	233	1.097	<i>N</i> -(2,4,6-decatrienoil)piperidina <b>3</b>
2	4.775	135	275	32.040	4,5-dihidropiperlonguminina <b>4</b>
3	5.713	135	289	10.770	6-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)- <i>N</i> -isobutilhex-3-enamida <b>5</b>
4	9.667	135	315	4.543	4,5,6,7-tetrahidropiperretina <b>6</b>
5	10.984	135	313	51.550	6,7-dihidropiperretina <b>7</b>

El espectro de masas correspondiente al pico # 1 del cromatograma de la Figura 23 es el mismo del pico # 5 del cromatograma de la fracción 28 (Figura 21), el cual corresponde al compuesto *N*-(2,4,6-decatrienoil)piperidina **3**. Para el método de volátiles el compuesto presenta un tiempo de retención TR = 48.406 min y para el método terpenos TR = 3.640 min.

En la Figura 24 se observa el pico del ion molecular a m/z 275 para el pico # 2 del cromatograma de la Figura 23.

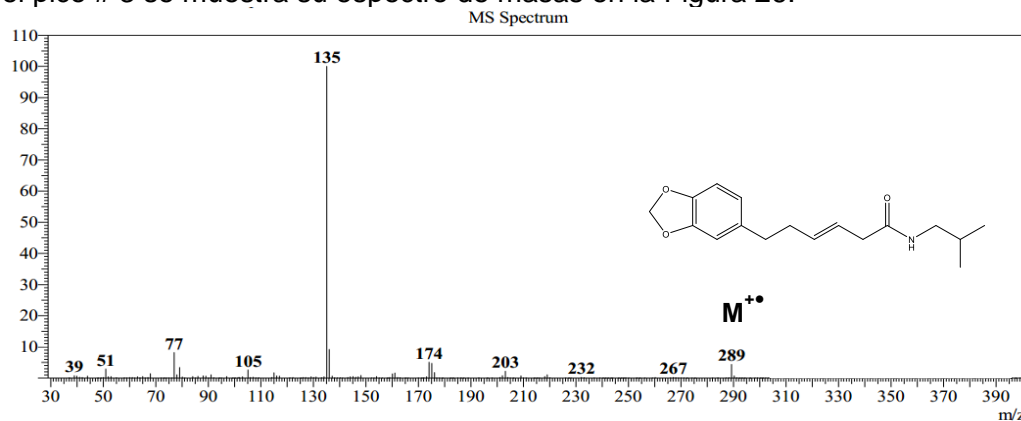


**Figura 24.** Espectro de masas del compuesto 4,5-dihidropiperlonguminina **4**.

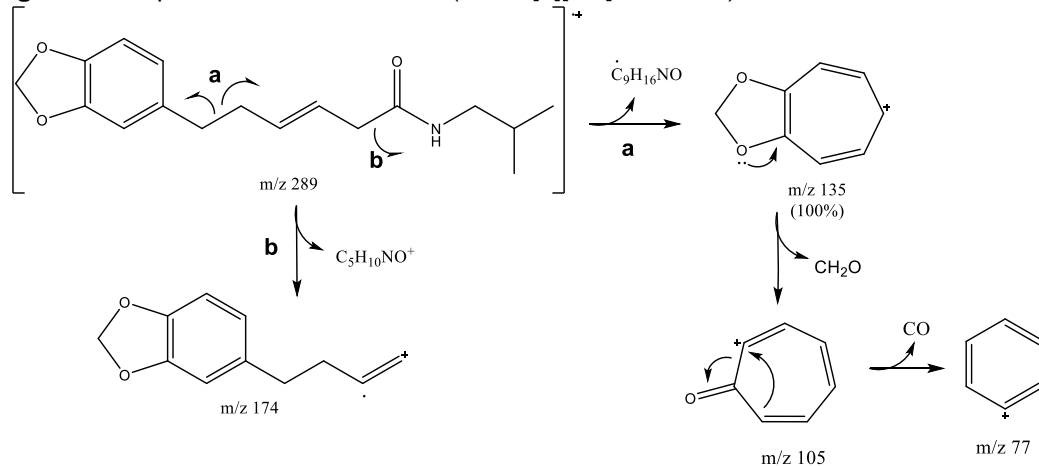


**Figura 25.** Fragmentaciones propuestas para la molécula 4,5-dihidropiperlonguminina **4**.

Para el pico # 3 se muestra su espectro de masas en la Figura 26.



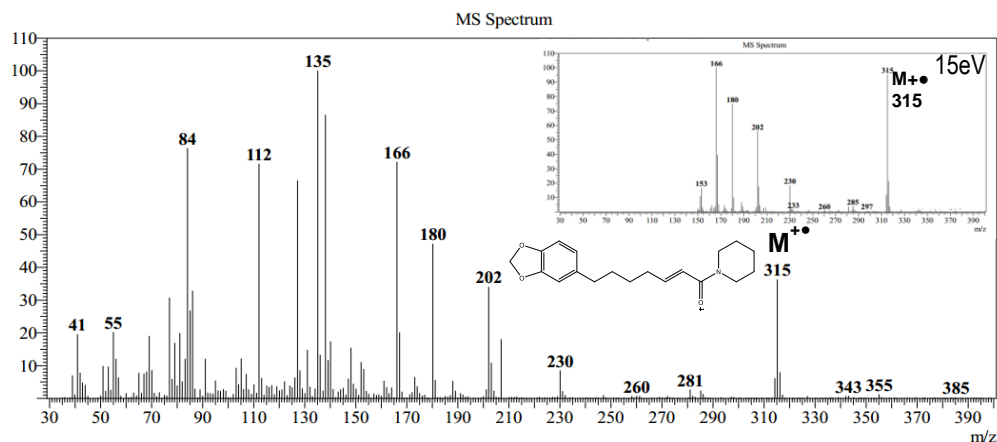
**Figura 26.** Espectro de masas de la 6-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-*N*-isobutylhex-3-enamida **5**.



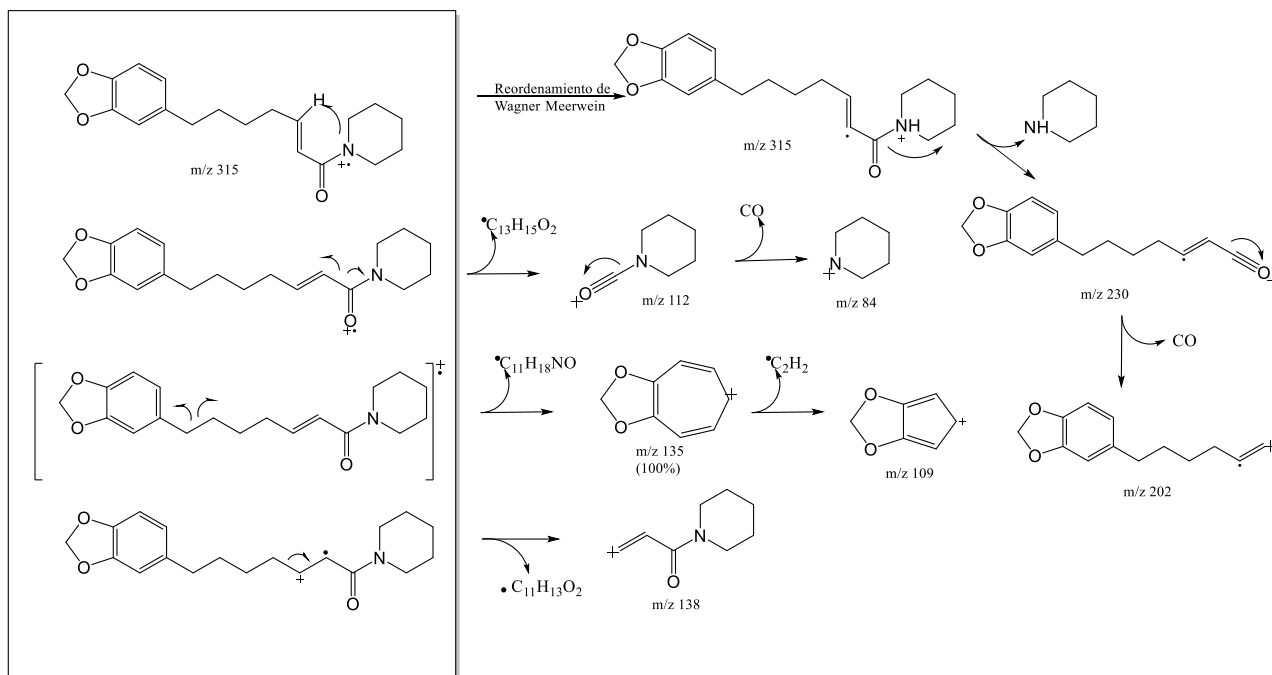


**Figura 27.** Fragmentaciones propuestas para la molécula 6-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-*N*-isobutilhex-3-enamida **5**.

En la Figura 28 se muestra el espectro de masas que origina el pico # 4 del cromatograma de la Figura 23. Se observa un pico de ion molecular de  $m/z$  315.

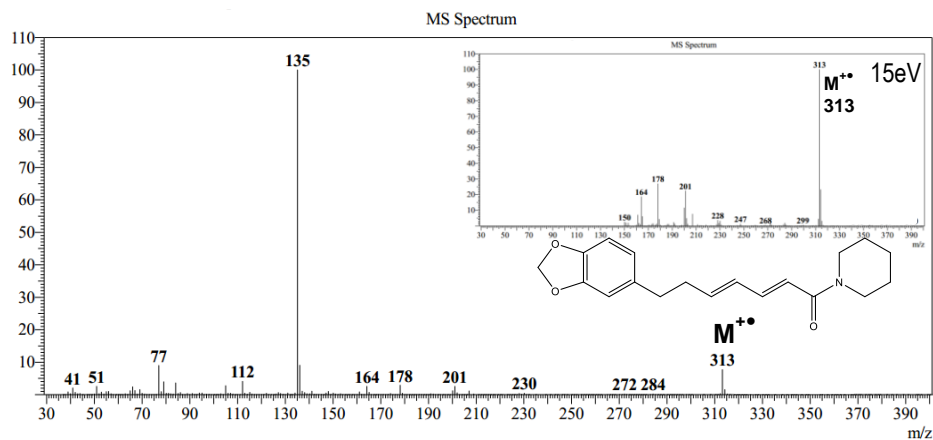


**Figura 28.** Espectro de masas del compuesto 4,5,6,7-tetrahidropiperretina **6**.

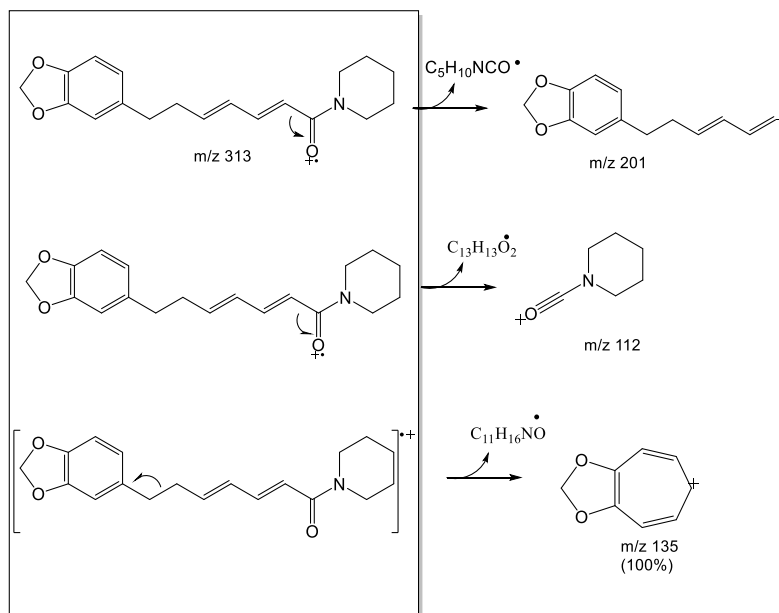


**Figura 29.** Fragmentaciones propuestas para la molécula 4,5,6,7-tetrahidropiperretina **6**.

Finalmente, el espectro de masas del pico # 5 del cromatograma de la Figura 23 se muestra en la Figura 30 donde se observa un pico del ion molecular a  $m/z$  313.



**Figura 30.** Espectro de masas del compuesto 6,7-dihidropiperretina **7**.

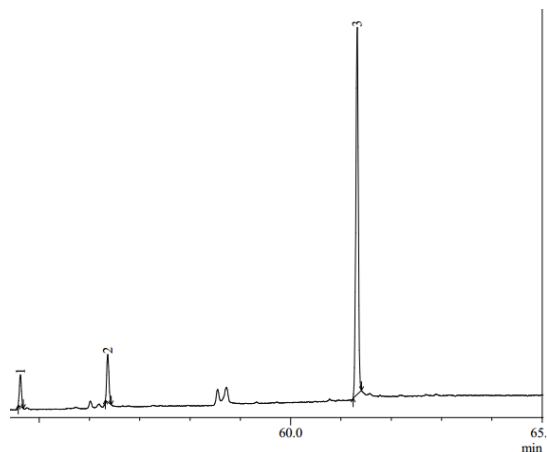


**Figura 31.** Fragmentaciones propuestas para la molécula 6,7-dihidropiperretina **7**.

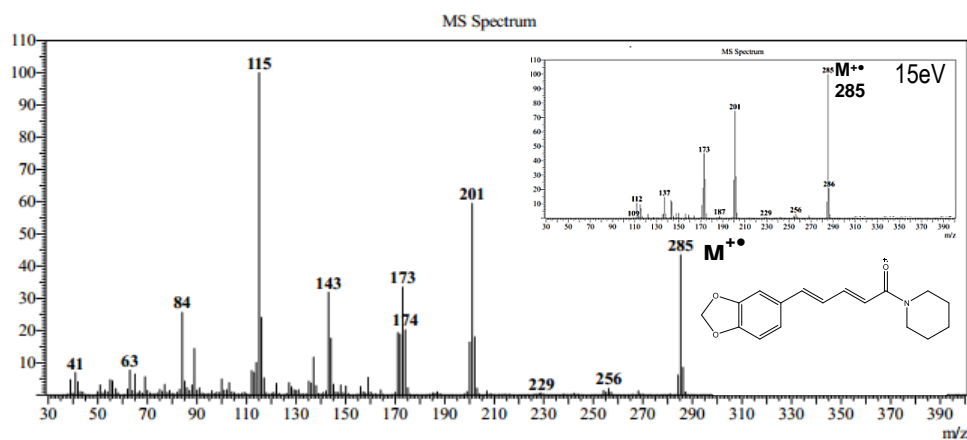
De la fracción 31 se obtuvo el cromatograma mostrado en la Figura 32 donde se observa un pico intenso. Este pico corresponde a la piperina **8**, en la Figura 33 se observa el pico del ion molecular a  $m/z$  285 y en la Figura 36 las fragmentaciones que sufre la molécula.

**Tabla 7.** Compuestos analizados por CG-EM para la fracción 29.

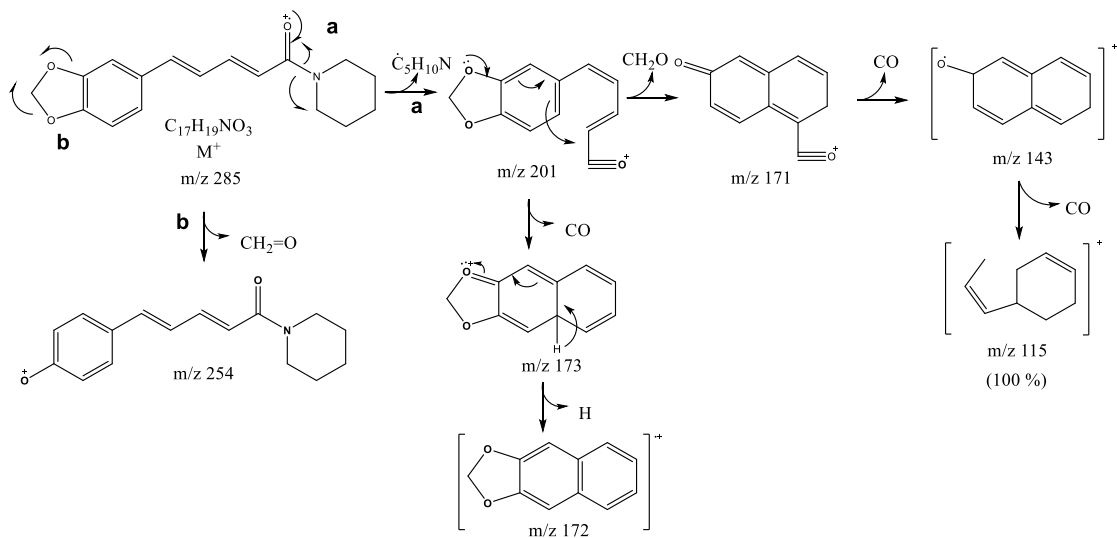
Pico	TR (min)	Pico base (m/z)	M <sup>+</sup> • (m/z)	Área (%)	Nombre del compuesto
2	61.323	115	285	64.690	Piperina <b>8</b>



**Figura 32.** Cromatograma de la fracción 31 de la fracción Pt1.1, método volátiles.



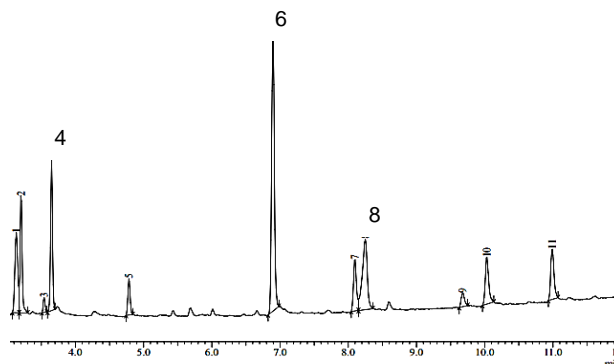
**Figura 33.** Espectro de masas del compuesto piperina **8**.



**Figura 34.** Fragmentaciones propuestas para la molécula piperina **8**.

### 6.1.3. Análisis por espectrometría de masas acoplado a cromatografía de gases para caracterización de compuestos tipo amida presentes en la fracción de Alcaloides Totales provenientes de Pt1.

El cromatograma de la fracción de alcaloides totales se muestra en la Figura 35, donde se identificaron 7 picos significativos (picos # 2, 4, 5, 6, 7, 8 y 11).

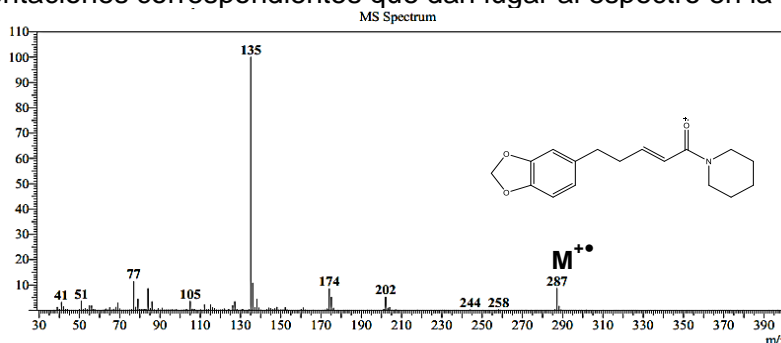


**Figura 35.** Cromatograma de alcaloides totales extraídos del extracto de hexano de las semillas de *Piper tuberculatum*, método terpenos.

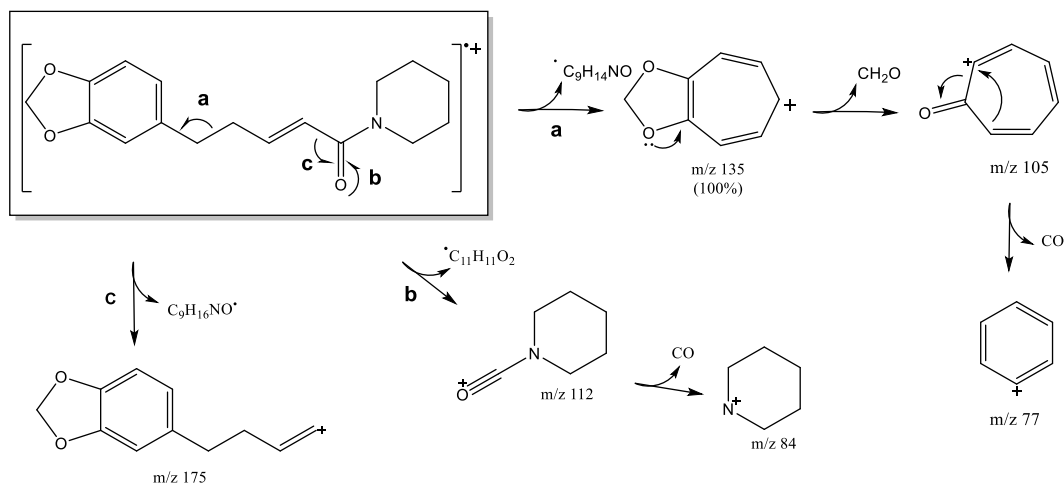
**Tabla 8.** Compuestos analizados por CG-EM para la fracción de alcaloides totales.

Pico	TR (min)	Pico base (m/z)	M <sup>+</sup> • (m/z)	Área (%)	Nombre del compuesto
2	3.204	84	235	3.550	<i>N</i> -(2,4-decadienol)piperidina <b>2</b>
4	3.650	107	233	3.691	<i>N</i> -(2,4,6-decatrienol)piperidina <b>3</b>
5	4.785	135	275	7.232	4,5-dihidropiperlonguminina <b>4</b>
6	6.896	135	287	49.809	4,5-dihidropiperina <b>9</b>
7	8.097	115	285	2.784	Piperina <b>8</b>
8	8.251	115	285	6.051	Pierina <b>8</b>
11	10.989	135	313	13.665	6,7-dihidropiperretina <b>7</b>

El pico # 2 corresponde al compuesto *N*-(2,4-decadienol)piperidina **2** cuyo espectro de masas y fragmentaciones se encuentran en las Figuras 19 y 20 respectivamente. El compuesto correspondiente al pico # 4 es *N*-(2,4,6-decatrienol)piperidina **3** (Figura 21 y 22), el pico # 5 es debido a la presencia de dihidropiperlongumina **4** (Figura 24 y 25), el # 6 corresponde a la dihidropiperina **9** cuyo espectro de masas se muestra en la Figura 36 con las fragmentaciones correspondientes que dan lugar al espectro en la Figura 37.



**Figura 36.** Espectro de masas del compuesto 4,5-dihidropiperina **9**.



**Figura 37.** Fragmentaciones propuestas para la molécula 4,5-dihidropiperina **9**.

Los picos # 7 y # 8 corresponden a isómeros de la piperina **8** (Figuras 33 y 34) y finalmente el pico # 11 es debido al compuesto 6,7-dihidropiperretina **7** (Figuras 30 y 31).

#### 6.1.4. Elucidación por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) mono y bidimensional de la piperina **8**.

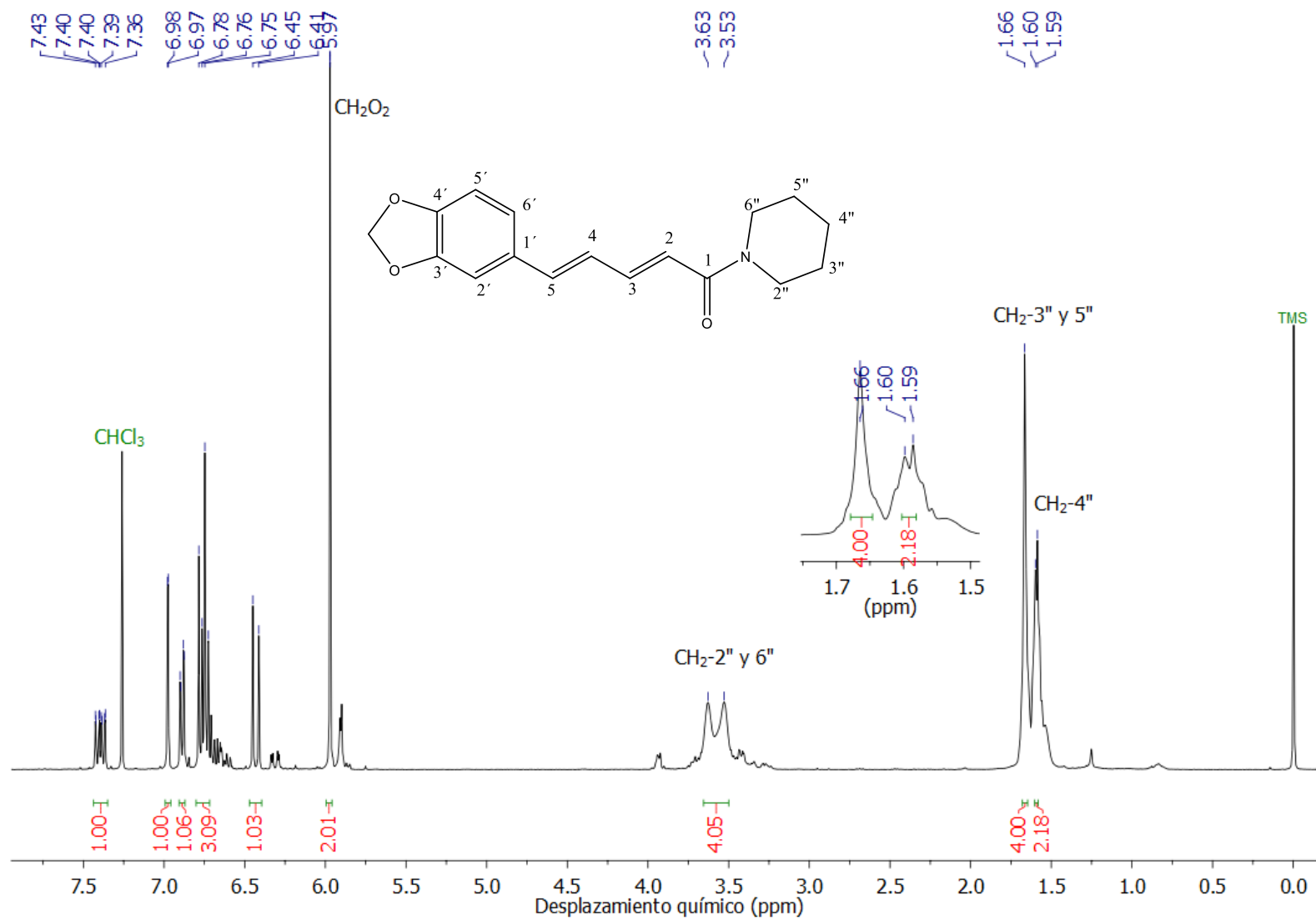
En los espectros RMN- $^1\text{H}$ , COSY- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , RMN- $^{13}\text{C}$ , HSQC y HMBC (Figuras 38-48) tomados en  $\text{CDCl}_3$ , muestran las señales que se asignan en la Tabla 4. En el espectro RMN- $^1\text{H}$  se asignaron inicialmente las señales para los protones H-2", H-3", H-4", H-5", H-6" ya que estas se encuentran a campo más alto, los protones H-2" y H-6" se encuentran desplazadas a campo más bajo debido al efecto inductivo que genera el nitrógeno. La señal para el  $\text{CH}_2\text{O}_2$  fue asignada debido a que es el único singlete presente en el espectro ( $\delta$  5.97 ppm). La señal del protón H-3 ( $\delta$  7.40 ppm) se encuentra desplazado a campo bajo debido al efecto inductivo del grupo carbonilo.

En el espectro COSY- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figuras 40-41) se asignaron las señales de los protones H-2 y H-5 por correlación con el protón H-3 a dos ( $^2\text{J}$ ) y tres ( $^3\text{J}$ ) enlaces respectivamente. En el espectro  $^{13}\text{C}$  (Figura 42) se observan las 17 señales esperadas; con la ayuda del experimento DEPT-135 se determinó la existencia de 4 carbonos cuaternarios de los cuales se identifica el grupo carbonilo a  $\delta$  165.59 ppm, y como no hay grupos metilos en la molécula, las señales en fase normal corresponden a los carbonos metilénicos:  $\text{CH}_2\text{O}_2$  a  $\delta$  101.41 ppm y los correspondientes al grupo piperidinico (C-2", C-3", C-4", C-5" y C-6").

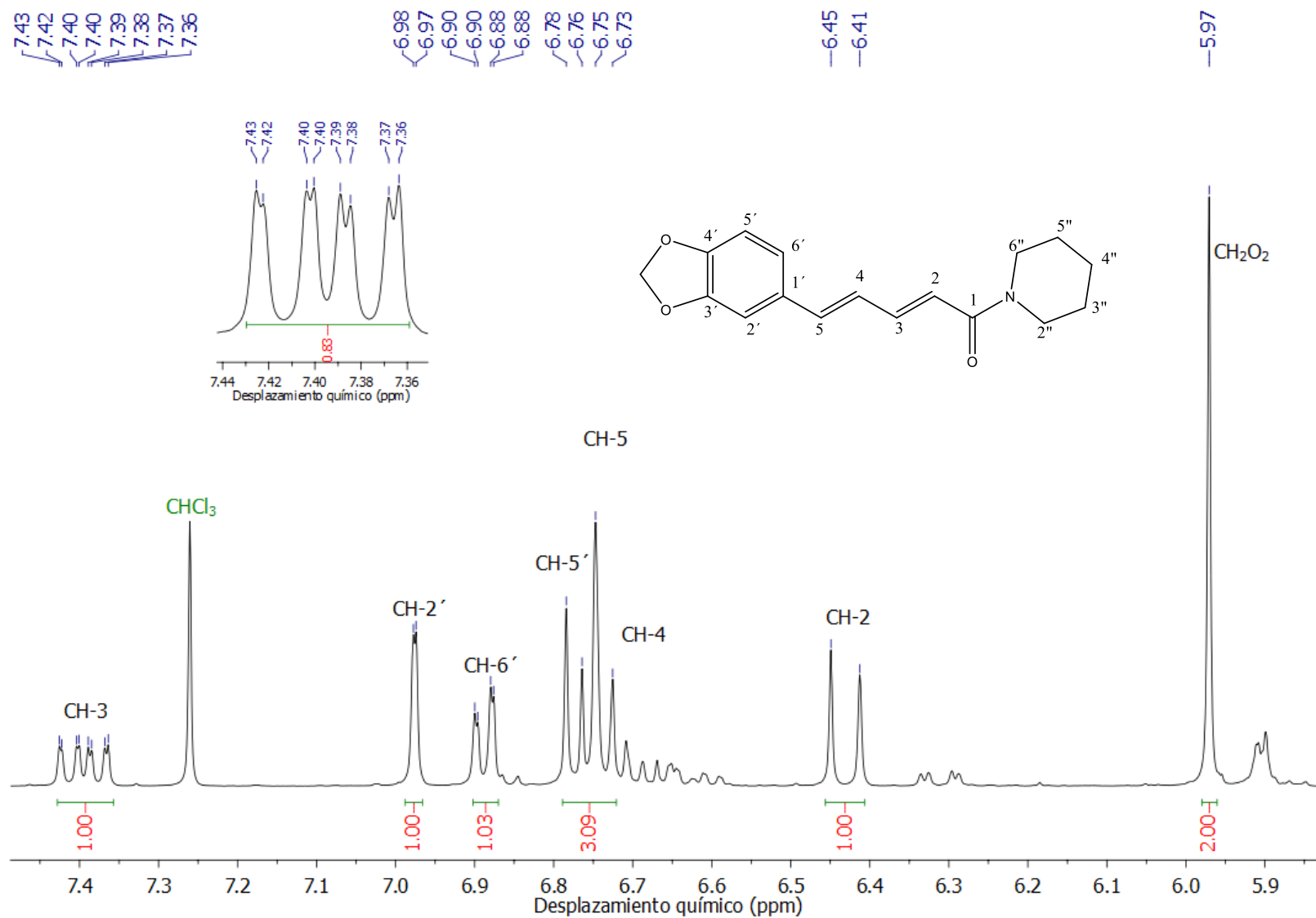
Seguido a esto, con ayuda del experimento HSQC (Figuras 43-45), fue posible correlacionar los protones con sus respectivos carbonos secundarios y terciarios. Finalmente se asignaron las señales faltantes mediante acoplamiento a dos ( $^2\text{J}$ ) y tres ( $^3\text{J}$ ) enlaces observados en el experimento HMBC (Figuras 46-47).

**Tabla 9.** Datos de RMN-<sup>1</sup>H, COSY-<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C, HSQC y HMBC (CDCl<sub>3</sub>) para la piperina **8**.

	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>1</sup> H <sup>1</sup> H-COSY	HMBC
1	165.59	-	-	-
2	120.23	6.43 (1H, d, <i>J</i> = 14.7 Hz)	H-3	125.52, 165.59
3	142.61	7.40 (1H, c, <i>J</i> = 14.7, 10.3 Hz)	H-2, H-4	-
4	125.52	6.73 - 6.75 (1H, m)	H-3	142.61
5	138.36	6.75 - 6.78 (1H, m)	H-6'	105.83, 131.19
1'	131.19	-	-	-
2'	105.83	6.98 (1H, s)	-	131.19
3'	148.34	-	-	-
4'	148.26	-	-	-
5'	108.63	6.76 - 6.78 (1H, m)	H-6'	-
6'	122.63	6.89 (1H, d, <i>J</i> = 7.9 Hz)	H-5, H-2', H-5'	105.83, 138.36, 148.26, 148.34
CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	101.41	5.97 (2H, s)	-	24.82, 27.12
2''	43.36	3.53 - 3.63 (4H, m)	H-4'', H-3'', H-5''	-
3''	24.82	1.66 (4H, s)	H-2'', H-6''	-
4''	27.12	1.59 - 1.60 (2H, m)	H-2'', H-6''	24.82, 25.75
5''	25.75	1.66 (4H, s)	H-2'', H-6''	-
6''	47.04	3.53 - 3.63 (4H, m)	H-3'', H-4'', H-5''	-

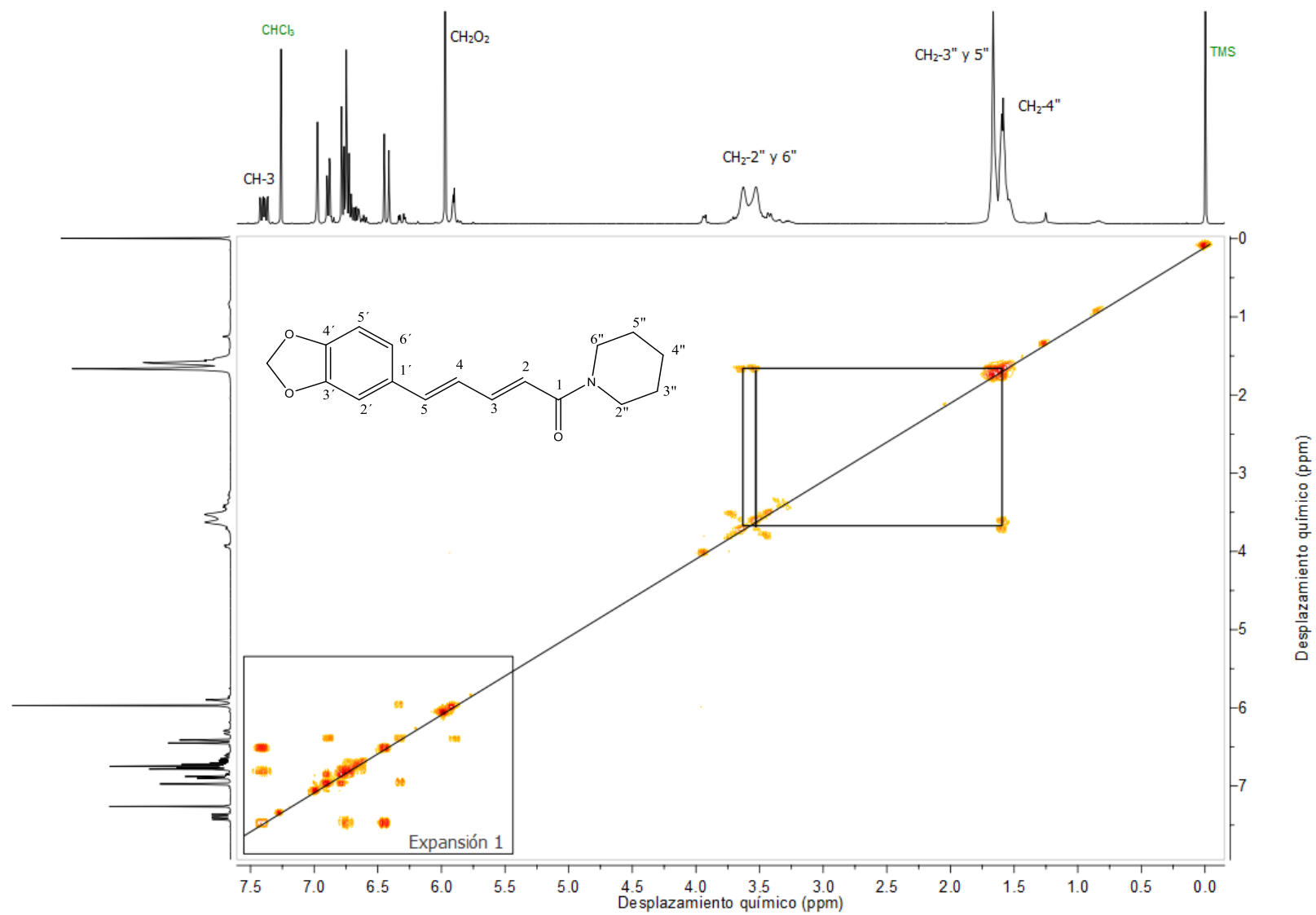


**Figura 38.** Espectro RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) de la piperina **8**.

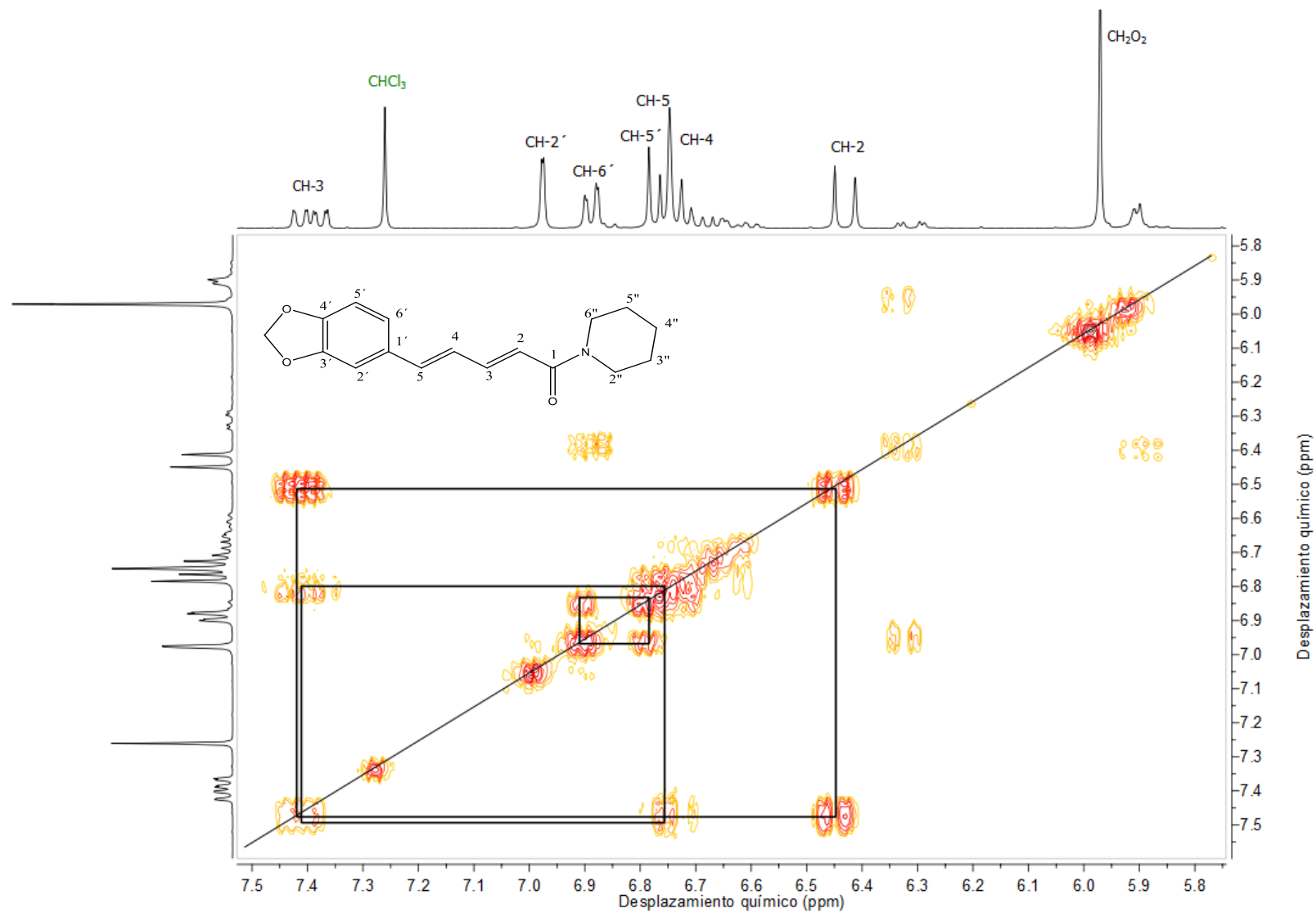


**Figura 39.** Expansión 1 del espectro RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) de la piperina **8**.





**Figura 40.** Espectro COSY-<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) de la piperina **8**.



**Figura 41.** Expansión 1 del espectro COSY-<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) de la piperina **8**.

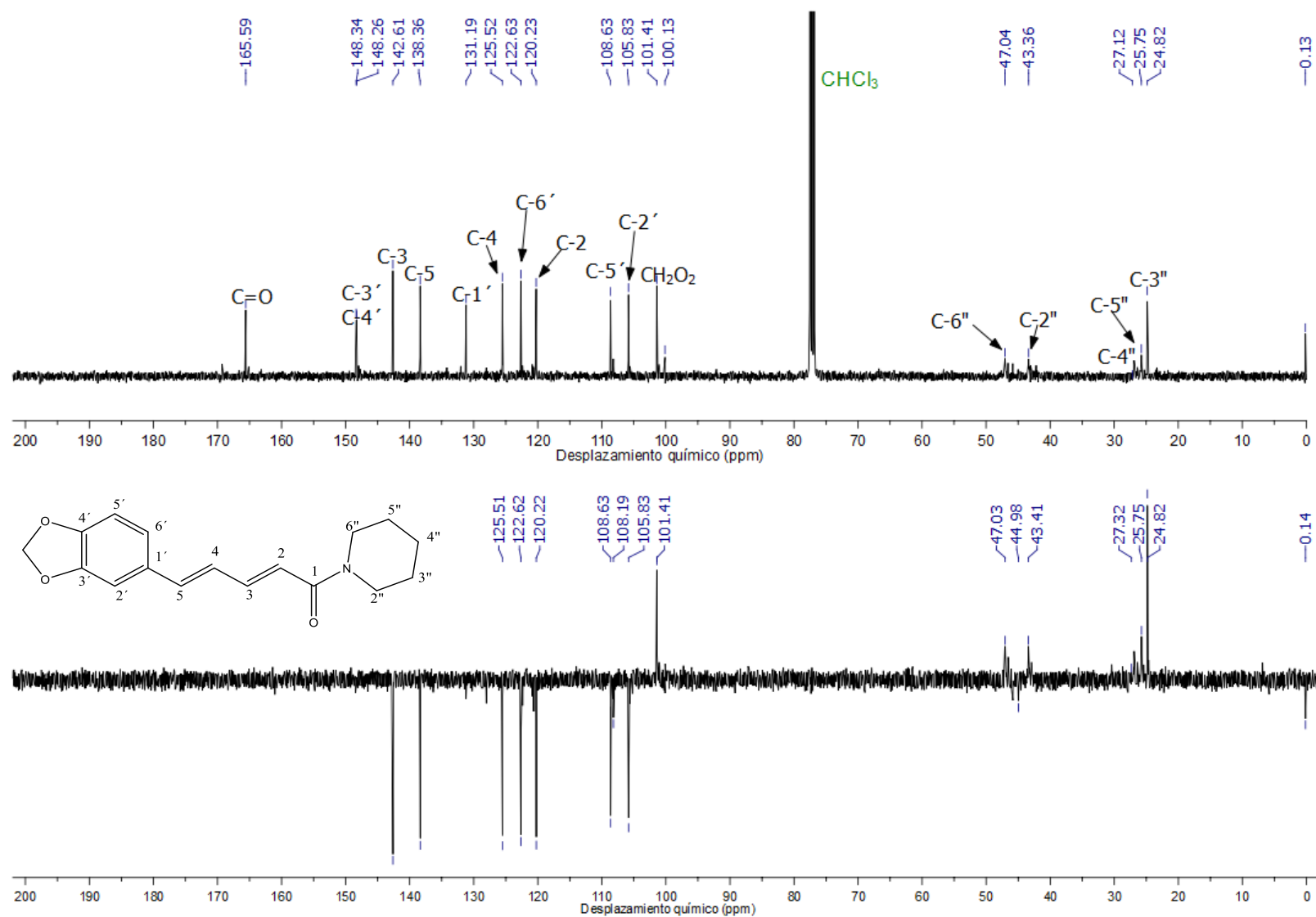
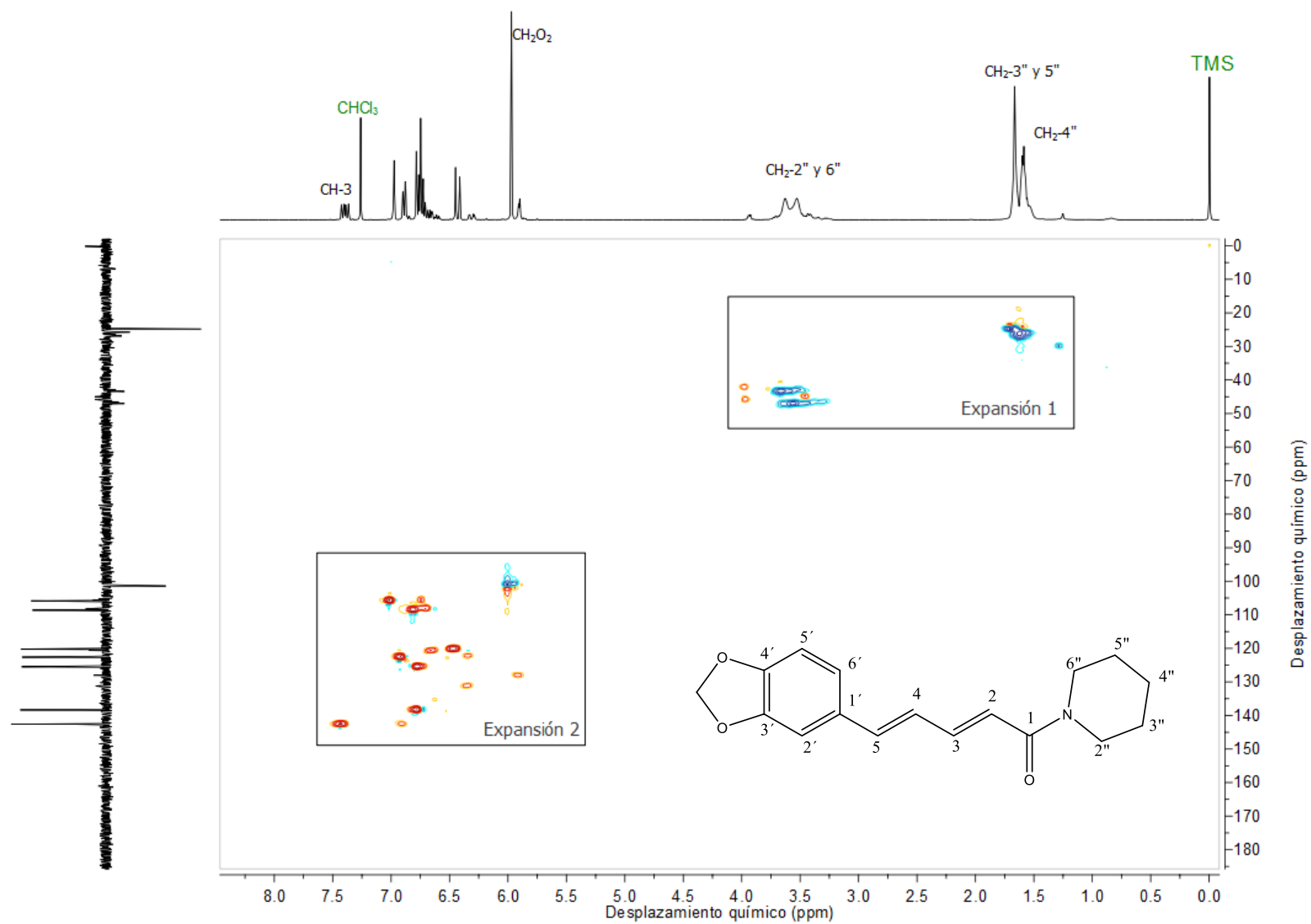
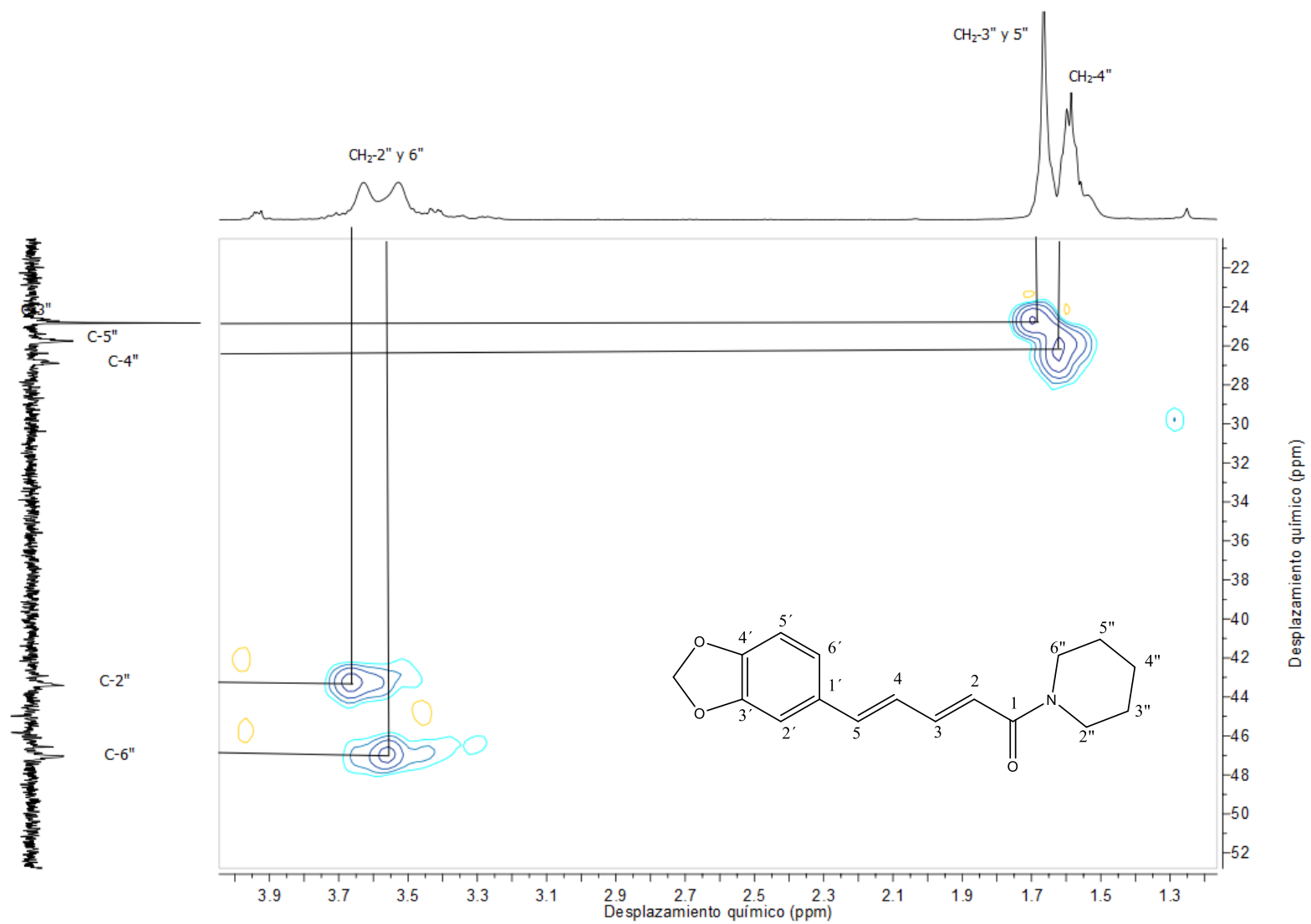


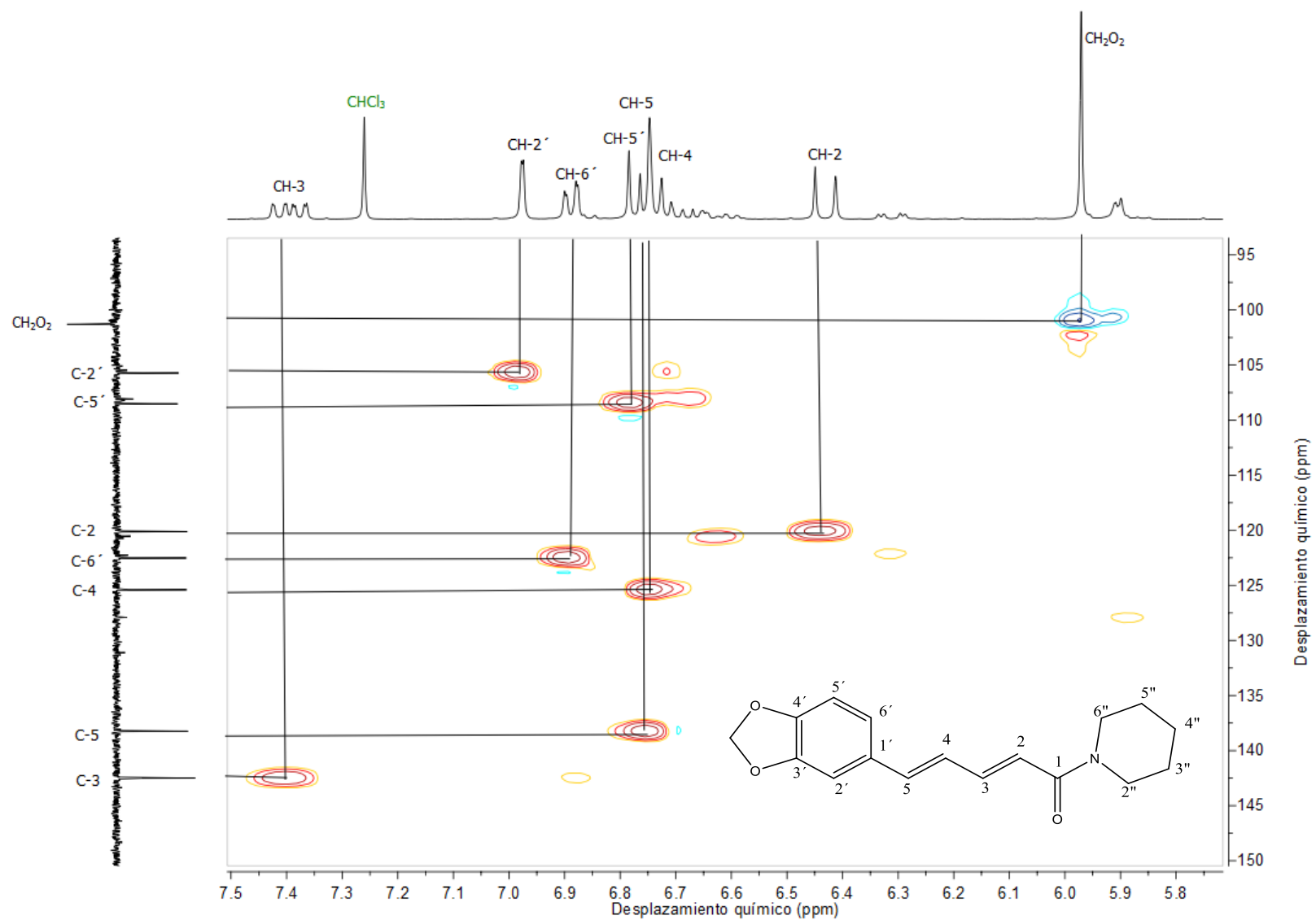
Figura 42. Espectro RMN-<sup>13</sup>C y DEPT-135 (CDCl<sub>3</sub>) de la piperina 8.



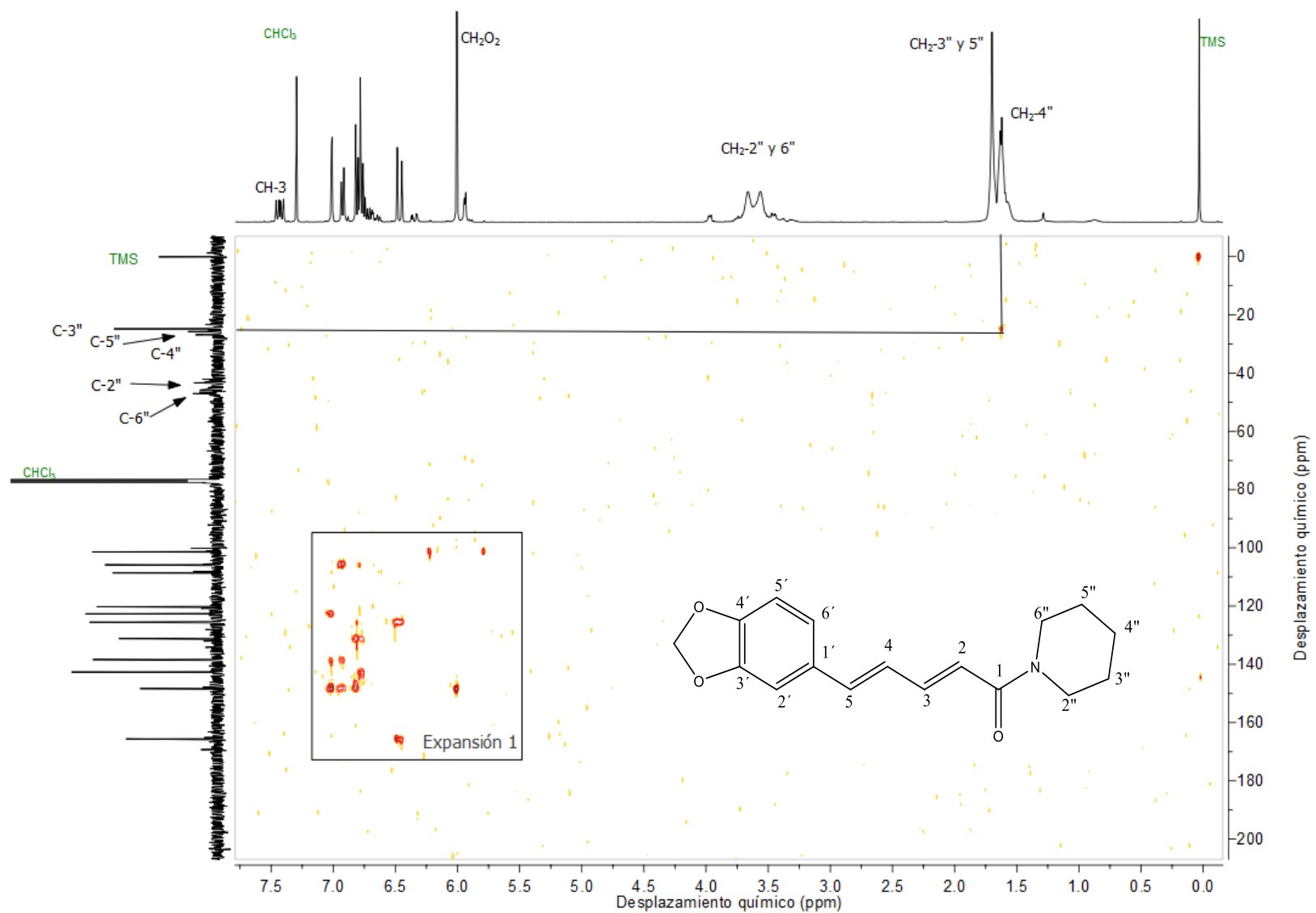
**Figura 43.** Espectro HSQC (CDCl<sub>3</sub>) de la piperina **8**.



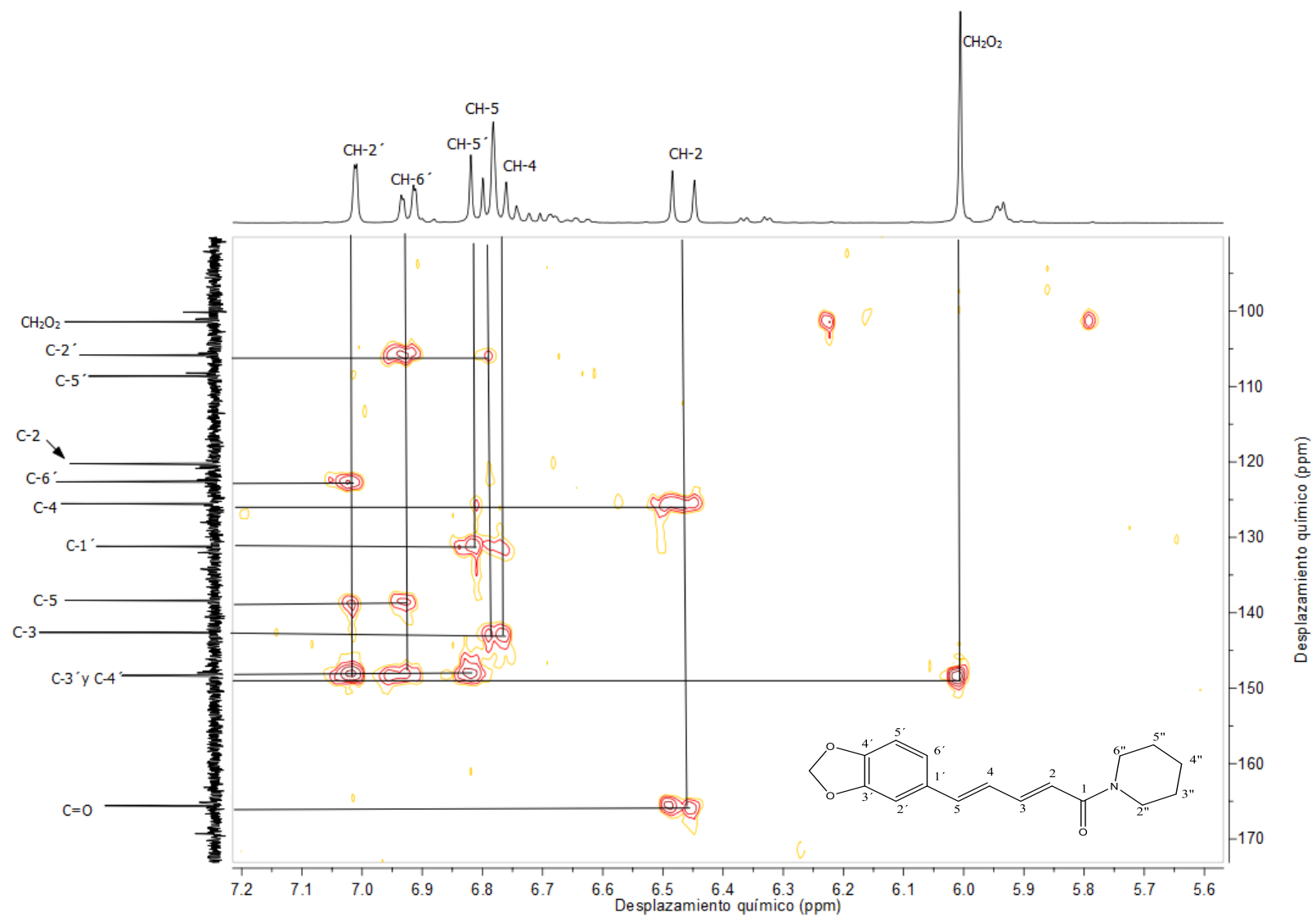
**Figura 44.** Expansión 1 del espectro HSQC ( $\text{CDCl}_3$ ) de la piperina **8**.



**Figura 45.** Expansión 2 del espectro HSQC ( $\text{CDCl}_3$ ) de la piperina **8**.



**Figura 46.** Espectro HMBC (CDCl<sub>3</sub>) de la piperina **8**.



**Figura 47.** Expansión 1 del espectro HMBC (CDCl<sub>3</sub>) de la piperina **8**.



## 6.2. EXTRACTO DE ACETONA 70% (Pt3)

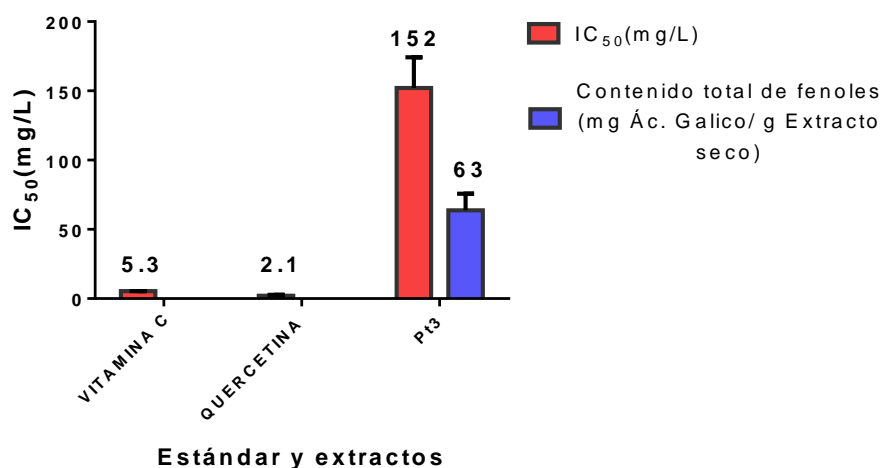
### 6.2.1. Pruebas cualitativas preliminares

Las pruebas presuntivas mostraron presencia de fenoles y alcaloides en el extracto de acetona 70% (Pt3) por lo que se realizó extracción de alcaloides totales, este fue analizado por espectrometría de masas acoplado a cromatografía de gases. Además, se determinó la capacidad captora de radicales mediante el radical DPPH, y se estimó el contenido total de fenoles por el método Folin-Ciocalteu.

### 6.2.2. Cuantificación de la actividad captora de radicales y estimación del contenido total de fenoles del extracto acetona 70% (Pt3) por el método de Folin-Ciocalteu

En el género *Piper* se han encontrado lignanos, taninos, saponinas, compuestos fenólicos, terpenos, flavonoides, alcaloides, entre otros, de los cuales los fenoles y flavonoides son responsables de la actividad antioxidante<sup>25</sup>. Para el extracto Pt3 de las semillas de *P. tuberculatum* se determinó un valor de  $IC_{50} = 152 \pm 22$  mg/L tal como se muestra en la Figura 48, si se compara este valor con el valor obtenido para la quercetina que tiene un  $IC_{50} = 2,1$  o la vitamina C con  $IC_{50} = 5,3$  se observa que el extracto obtenido tiene una buena actividad captora del radical DPPH, ya que se trata de un extracto, que consta de una mezcla compleja de compuestos.

El extracto contiene compuestos con hidrógenos ácidos que al ser liberados dan lugar a radicales altamente estabilizados, causando la actividad antioxidante. Regasini, L.O. y colaboradores<sup>26</sup> estudiaron la actividad captora de radicales DPPH en extractos de acetato de etilo y de agua:metanol de las hojas de *P. tuberculatum*, donde obtuvieron valores de  $IC_{50} = 8.40$  mg/L y  $IC_{50} = 11.9$  mg/L respectivamente.



**Figura 48.** Comparación de la actividad captora del radical DPPH de los estándares Vitamina C y quercetina y estimación del contenido total de fenoles para el extracto Pt3 de las semillas de *Piper tuberculatum*.

Para el extracto Pt3 se estimó el contenido total de fenoles por el método Folin-Ciocalteu obteniéndose un valor de  $63 \pm 11$  mg AG/g ES este valor es coherente con la actividad captora del radical DPPH encontrada para la fracción.

## 7. CONCLUSIONES

A partir del análisis por CG-EM de las fracciones de la fracción Pt1.1, se elucidaron 9 compuestos tipo amida: pellitorina **1**, *N*-(2,4-decadienoil)piperidina **2**, *N*-(2,4,6-decatrienoil)piperidina **3**, 4,5-dihidropiperlonguminina **4**, 6-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-*N*-isobutilhexenamida **5**, 4,5,6,7-tetrahidropiperretina **6**, 6,7-dihidropiperretina **7**, piperina **8** y 4,5-dihidropiperina **9**.

Los compuestos *N*-(2,4,6-decatrienoil)piperidina **3**, 6-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-*N*-isobutilhexenamida **5** y 4,5,6,7-tetrahidropiperretina **6** son reportados por primera vez para la especie *P. tuberculatum* lo que indica que este trabajo contribuye al conocimiento de los metabolitos secundarios presentes en esta especie.

Se determinó la capacidad captora de radicales para el extracto de acetona 70% (Pt3) de las semillas de *Piper tuberculatum* que presentó un  $IC_{50} = 152 \pm 22$  mg/L, el cual es un buen valor ya que la muestra analizada se trata de un extracto, el cual contiene una gran mezcla de compuestos. Esto indica que el extracto es promisorio para el aislamiento e identificación de los metabolitos que generan esta actividad.

Para la piperina **8** aislada se confirmó su estructura por análisis de RMN unidimensional y bidimensional.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Ciccío, J. F. Metabolitos Secundarios Y Quimiotaxonomía. In *Introducción a la flora de Costa Rica*; Editorial de la Universidad de Costa Rica: San José, Costa Rica, 1991.
- (2) UNAL. Piper tuberculatum Jacq. - Piperaceae <http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/?controlador=ShowObject&accion=show&id=176365>.
- (3) Palacios, Z. G. F.; Delgado, G. E.; Moreno, M. C.; Kato, M. J.; Rojas, C. In Vitro Antifungal Activity of Crude Extracts of Piper Tuberculatum. *Rev. peru. biol.* **2009**, *16*, 209–214.
- (4) Navickiene D, H. M.; Alécio, A. C.; Kato, M. J.; Bolzani, V. da S.; Young, M. C. M.; Cavaleiro, A. J.; Furlan, M. Antifungal Amides from Piper Hispidum and Piper Tuberculatum. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 621–626.
- (5) Lago, J. H. G.; Ramos, C. S.; Casanova, D. C. C.; Morandim, A. D. a; Bergamo, D. C. B.; Cavaleiro, A. J.; Bolzani, V. D. S.; Furlan, M.; Guimarães, E. F.; Young, M. C. M.; et al. Benzoic Acid Derivatives from Piper Species and Their Fungitoxic Activity against Cladosporium Cladosporioides and C. Sphaerospermum. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1783–1788.
- (6) Jensen, H. R.; Scott, I. M.; Sims, S.; Trudeau, V. L.; Arnason, J. T. Gene Expression Profiles of Drosophila Melanogaster Exposed to an Insecticidal Extract of Piper Nigrum. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 1289–1295.
- (7) Molina-Torres, J.; Salazar-Cabrera, C. J.; Armenta-Salinas, C.; Ramírez-Chávez, E. Fungistatic and Bacteriostatic Activities of Alkamides from Heliopsis Longipes Roots: Affinin and Reduced Amides. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4700–4704.
- (8) Scott, I. M.; Puniani, E.; Jensen, H.; Livesey, J. F.; Poveda, L.; Sanchez-Vindas, P.; Durst, T.; Arnason, J. T. Analysis of Piperaceae Germplasm by HPLC and LCMS: A Method for Isolating and Identifying Unsaturated Amides from Piper Spp Extracts. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1907–1913.
- (9) Facundo, V. A.; Polli, A. R.; Rodrigues, R. V.; Militao, J. S. L. T.; Stabelli, R. G.; Cardoso, C. T. Fixed and Volatile Chemical Constituents from Stems and Fruits of Piper Tuberculatum Jacq. and from Roots of P. Hispidum H.B.K. *Acta Amaz.* **2010**, *38*, 743–748.
- (10) Friedman, M.; Levin, C. E.; Lee, S.-U.; Lee, J.-S.; Ohnisi-Kameyama, M.; Kozukue, N. Analysis by HPLC and LC/MS of Pungent Piperamides in Commercial Black, White, Green, and Red Whole and Ground Peppercorns. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3028–3036.
- (11) Lee, S. W.; Mandinova, A. Piperlongumine and Piperlongumine Analogs for Use in the Treatment of Cancer. US20090312373, 2009.
- (12) Ordaz, G.; Armas, H. D.; Yáñez, D.; Moreno, S. Composición Química de Los Aceites Esenciales de Las Hojas de Helicteres Guazumifolia (Sterculiaceae), Piper Tuberculatum (Piperaceae), Scoparia Dulcis (Arecaceae) Y Solanum Subinerme (Solanaceae), Recolectadas En Sucre, Venezuela. *Rev. Biol. Trop.* **2011**, *59*, 585–595.

- (13) Bezerra, D. P.; Moura, D. J.; Rosa, R. M.; de Vasconcellos, M. C.; e Silva, A. C. R.; de Moraes, M. O.; Silveira, E. R.; Lima, M. A. S.; Henriques, J. A. P.; Costa-Lotufo, L. V.; et al. Evaluation of the Genotoxicity of Piplartine, an Alkamide of Piper Tuberculatum, in Yeast and Mammalian V79 Cells. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2008**, 652, 164–174.
- (14) De, P.; Koumba Yoya, G.; Constant, P.; Bedos-Belval, F.; Duran, H.; Saffon, N.; Daffé, M.; Baltas, M. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of New Cinnamic Derivatives as Antituberculosis Agents. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 1449–1461.
- (15) Kim, S.; Lim, C.; Lee, S.; Lee, S.; Cho, H.; Lee, J.-Y.; Shim, D. S.; Park, H. D.; Kim, S. Column Chromatography-Free Solution-Phase Synthesis of a Natural Piper-Amide-like Compound Library. *ACS Comb. Sci.* **2013**, 15, 208–215.
- (16) Fowler, A.; Goralczyk, R.; Kilpert, C.; Mohajeri, H.; Schweikert, L. Black Pepper Extract or Its Constituents for Improving Mental Performance. EP2289528A1, 2011.
- (17) Castral, T. C.; Matos, A. P.; Monteiro, J. L.; Araujo, F. M.; Bondancia, T. M.; Batista-Pereira, L. G.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; da Silva, M. F. G. F.; Corrêa, A. G. Synthesis of a Combinatorial Library of Amides and Its Evaluation against the Fall Armyworm, Spodoptera Frugiperda. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 4822–4827.
- (18) Trindade, F. T. T.; Stabeli, R. G.; Facundo, V. A.; Cardoso, C. T.; Silva, M. A. da; Gil, L. H. S.; Silva-Jardim, I.; Silva, A. de A. e. Evaluation of Larvicidal Activity of the Methanolic Extracts of Piper Alatabaccum Branches and P. Tuberculatum Leaves and Compounds Isolated against Anopheles Darlingi. *Rev. Bras. Farm.* **2012**, 22, 979–984.
- (19) Burci, L. M.; Pereira, I. T.; da Silva, L. M.; Rodrigues, R. V.; Facundo, V. A.; Militão, J. S. L. T.; Santos, A. R. S.; Marques, M. C. A.; Baggio, C. H.; Werner, M. F. de P. Antiulcer and Gastric Antisecretory Effects of Dichloromethane Fraction and Piplartine Obtained from Fruits of Piper Tuberculatum Jacq. in Rats. *J. Ethnopharmacol.* **2013**, 148, 165–174.
- (20) Kim, S.; Lim, C.; Lee, S.; Lee, S.; Cho, H.; Lee, J.-Y.; Shim, D. S.; Park, H. D.; Kim, S. Column Chromatography-Free Solution-Phase Synthesis of a Natural Piper-Amide-like Compound Library. *ACS Comb. Sci.* **2013**, 15, 208–215.
- (21) Hoffman, A.; Domb, A. J.; Elgart, A.; CHERNIAKOV, I. Formulation and Method for Increasing Oral Bioavailability of Drugs, 2013.
- (22) Bazán-Calderón, J.; Ventura-Flores, R.; Kati, M.; Rojas-Idrogo, C.; Delgado-Paredes, G. Actividad Insecticida de Piper Tuberculatum Jacq. Sobre Aedes Aegypti L.(Diptera: Culicidae) Y Anopheles Pseudopunctipennis Tehobal (Diptera: Culicidae). *An. Biol.* **2011**, 33, 135–147.
- (23) Arango Acosta, G. J. *Alcaloides Y Compuestos Nitrogenados*; Antioquia, U. de, Ed.; Medellín, 2008; p 84.
- (24) Moraes, T.; De Araújo, M.; Bernardes, N.; De Oliveira, D.; Lasunskaja, E.; Muzitano, M.; Da Cunha, M. Antimycobacterial Activity an Alkaloid Prospection of Psychotria Species (Rubiaceae) from the Brazilian Atlantic Rainforest. *Planta Med.* **2011**, 77, 964–970.

- (25) Mesa, A. M.; Rincon, D. C.; Toro, J. F.; Tamayo, A.; Blair, S. Actividad Antioxidante de PIPER PIEDECUESTANUM TREL. & YUNCK. Y PIPER SUBPEDALE TREL. & YUNCK. *Rev. Latinoamer. Quím.* **2011**, 39, 91–99.
- (26) Regasini, L. O.; Cotinguiba, F.; Siqueira, J. R.; Bolzani, V. S.; Silva, D. H. S.; Furlan, M.; Kato, M. J. Radical Scavenging Capacity of Piper Arboreum and Piper Tuberculatum (Piperaceae). *Lat. Am. J. ogf Pharm.* **2008**, 27, 900–903.